

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de una posible implicación del virus de Epstein-Barr  
en la esclerosis múltiple**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Lorena López Lozano**

**Directores**

**Roberto Álvarez Lafuente**  
**Rafael Arroyo González**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA**

**Departamento de Inmunología**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE UNA POSIBLE IMPLICACIÓN DEL VIRUS  
DE EPSTEIN-BARR EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Lorena López Lozano**

**Madrid, 2019**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA**

**Departamento de Inmunología**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE UNA POSIBLE IMPLICACIÓN DEL VIRUS  
DE EPSTEIN-BARR EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Lorena López Lozano**

**Directores**

**Roberto Álvarez Lafuente  
Rafael Arroyo González**

**Madrid, 2019**





## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a toda la gente que ha hecho posible esta tesis.

Entre todos ellos en primer lugar, mis padres y mi hermana, por vuestro apoyo continuo no solo durante este proyecto, sino en cada paso que he dado en mi vida y que ha sido fundamental para que haya podido ir alcanzando poco a poco las metas soñadas. Esta tesis es uno más de esos objetivos que hemos conseguido juntos. ¡Gracias!

También quiero dar las gracias a David, por animarme siempre y lograr con tu positivismo que todo parezca posible. Gracias por mantener siempre esa sonrisa y apoyarme en todo, aunque muchas veces estuviese lejos. Desde que te conocí me he sentido la persona más querida del planeta y también gracias a ti esta tesis ha salido adelante.

Dos pilares muy importantes desde que nos conocimos cuando éramos residentes han sido Irene y Abba. Chicas, habéis sido mi familia cuando estaba en Madrid, además de mis amigas y compañeras de trabajo. Me habéis ayudado mucho con vuestros consejos y apoyo, y lo seguís haciendo, y por eso parte de esta tesis es vuestra también.

Otra de las personas que me ha ayudado muchísimo es Isabel, una gran amiga, una gran persona y una gran profesional en todo lo que se propone. Gracias por animarme tanto siempre. Al igual que Abba e Irene has sido mi familia y mi amiga en Madrid y sigues siendo una persona muy importante a día de hoy, por lo que otra parte de esta tesis es tuya también, por tu apoyo constante.

Un pedacito de esta tesis también corresponde al equipo de Ute Meier, Sofia Sisay y Priyamvada Dua, con el que trabajé en el Blizzard Institute de Londres. Con vosotras no solo aprendí, sino que además disfruté mucho, sois geniales.

Por otra parte, también quisiera agradecer a todos los residentes y facultativos del servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) de Madrid, por vuestra ayuda y apoyo durante los cuatro años que trabajé con vosotros, fue un verdadero placer.

Y por último quería dar las gracias a todo el equipo del Grupo de Investigación de Factores ambientales en enfermedades degenerativas, y especialmente a mis directores Roberto Álvarez y Rafael Arroyo, así como a mi tutor Miguel Fernández del servicio de Inmunología del HCSC, puesto que sin todos ellos esta tesis nunca habría sido posible. Gracias Roberto por tu paciencia, tu ayuda incansable, tu esfuerzo y tu apoyo desde el principio.

*...Ahora quedan lejos ya aquéllas tardes interminables en aquél sótano, saliendo por aquél pasillo eterno y oscuro al acabar, cuando ya era muchas veces de noche. Todo ese esfuerzo y más, está concentrado en las siguientes hojas que espero aporten nuestro granito de arena frente a esta enfermedad...*





## **ÍNDICE**



<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>1. EPIDEMIOLOGÍA .....</b>	<b>23</b>
<b>2. ETIOPATOGENIA .....</b>	<b>25</b>
2.1 FACTORES AMBIENTALES .....	25
2.1.1 Efecto latitudinal y exposición solar.....	25
2.1.2 Vitamina D.....	26
2.1.3 Tabaco. ....	27
2.1.4 Otros factores .....	28
2.1.5 Infecciones virales .....	29
2.1.5.1 Herpesvirus.....	30
2.1.5.1.2 EBV o Herpesvirus humano 4.....	32
2.2 FACTORES GENÉTICOS.....	35
2.2.1 Epistasis.....	36
2.3 MECANISMO INMUNOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD. ....	37
2.4 FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD.....	39
2.5 CLÍNICA.....	40
2.6 TRATAMIENTOS .....	41
2.6.1 Anticuerpos frente a tratamientos.....	47
2.7 DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD.....	48
<b>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS. ....</b>	<b>53</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS. ....</b>	<b>61</b>
<b>1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....</b>	<b>61</b>
<b>2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....</b>	<b>61</b>
<b>3. VARIABLES DE ESTUDIO.....</b>	<b>62</b>
<b>4. DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS .....</b>	<b>63</b>
<b>5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....</b>	<b>64</b>
<b>6. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN .....</b>	<b>65</b>
<b>7. GENOTIPADO DE SNPS.....</b>	<b>66</b>
7.1 SNPS DE ESTUDIO.....	67
<b>8. GENOTIPADO DE LOS HLA .....</b>	<b>74</b>
8.1 GENOTIPADO DEL ALELO DRB1*15:01 .....	75
<b>9. DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A EBNA-1 Y VCA. ....</b>	<b>76</b>
<b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>77</b>

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
<b>1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES BASALES DE ANTICUERPOS IGG ANTI-EBNA-1 Y ANTI-VCA EN RELACIÓN CON LOS FACTORES EDAD, DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN AÑOS, MSSS DE INICIO Y SEXO.</b>	<b>81</b>
<b>2. ANÁLISIS DE LA POSIBLE IMPLICACIÓN DEL EBV EN LA EVOLUCIÓN DE LA EM-RR. ....</b>	<b>84</b>
2.1 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI-EBNA-1 CON LOS BROTES. ....	86
2.2 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI-EBNA-1 CON LA PROGRESIÓN.....	89
2.3 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI-EBNA-1 CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	90
2.4 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI-VCA CON LOS BROTES. ....	93
2.5 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI-VCA CON LA PROGRESIÓN.....	95
2.6 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI-VCA CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	97
<b>3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IGG ANTI-EBNA-1 Y ANTI-VCA DEL EBV PREVIOS A CUALQUIER TRATAMIENTO, CON LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQA1 Y HLA-DQB1. ....</b>	<b>100</b>
<b>4. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IGG-ANTI EBNA-1 Y ANTI-VCA DEL EBV BASALES Y LOS SNPS ANALIZADOS.</b>	<b>106</b>
<b>5. ESTUDIO DE LOS INDIVIDUOS CONTROL. ....</b>	<b>108</b>
5.1 ESTUDIO DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IGG FRENTE A LOS ANTÍGENOS EBNA-1 Y VCA DEL EBV CON LOS FACTORES: SEXO, EDAD Y LA VARIANTE ALÉLICA DRB1*15:01 ASOCIADO A EM. ....	108
5.2. COMPARACIÓN ENTRE INDIVIDUOS CONTROL Y PACIENTES CON EM. .	109
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
<b>1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES BASALES DE ANTICUERPOS IGG ANTI-EBNA-1 Y ANTI-VCA EN RELACIÓN CON LOS FACTORES EDAD, SEXO, DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y MSSS. ....</b>	<b>113</b>
<b>2. ANÁLISIS DE LA POSIBLE IMPLICACIÓN DEL EBV EN LA EVOLUCIÓN DE LA EM-RR. ....</b>	<b>116</b>
2.1 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI EBNA-1 Y ANTI-VCA CON LOS BROTES.....	116
2.2 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI EBNA-1 Y ANTI- VCA CON LA PROGRESIÓN. ....	117
2.3 RELACIÓN ENTRE LAS VARIACIONES DEL ISR DE LAS IGG ANTI-EBNA-1 Y ANTI-VCA CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO. ....	120
<b>3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IGG ANTI-EBNA-1 Y ANTI-VCA DEL EBV PREVIOS A CUALQUIER TRATAMIENTO, CON LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQA1 Y HLA-DQB1.....</b>	<b>124</b>

<b>4. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IGG ANTI-EBNA-1 Y ANTI-VCA DEL EBV BASALES Y LOS SNPS ANALIZADOS.</b>	<b>130</b>
<b>5. ESTUDIO DE LOS INDIVIDUOS CONTROL. ....</b>	<b>135</b>
<i>5.1 ESTUDIO DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IGG FRENTE A LOS ANTÍGENOS EBNA-1 Y VCA DEL EBV CON LOS FACTORES: SEXO, EDAD Y LA VARIANTE ALÉLICA DRBI*15:01 ASOCIADO A EM.....</i>	<i>135</i>
<i>5.2. COMPARACIÓN ENTRE INDIVIDUOS CONTROL Y PACIENTES CON EM. .</i>	<i>138</i>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147</b>



## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

A: Adenina.

AG: acetato de glatiramero.

APC: Células presentadoras de antígenos.

ARNm: ARN mensajero.

BHE: Barrera hemato-encefálica.

C: Citosina

CIS: Síndrome clínico aislado

EAE: Encefalitis experimental autoinmune.

EBNA: Antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr.

EBV: Virus de Epstein-Barr.

EDSS: Expanded Disability Status Scale.

EM: Esclerosis múltiple.

EM-PP: Esclerosis múltiple primaria – progresiva.

EM-PR: Esclerosis múltiple progresiva – recurrente.

EM-RR: Esclerosis múltiple recurrente – remitente.

EM-SP: Esclerosis múltiple secundariamente progresiva.

FDA: Administración de medicamentos y alimentos.

G: Guanina.

GWAS: Estudio de asociación de genoma completo.

HCSC: Hospital Clínico San Carlos.

HERV: Retrovirus endógenos humanos.

HHV-6: Virus herpes humano tipo 6.

HLA: Complejo de histocompatibilidad humana.

HSV-1: Virus herpes humano tipo 1.

IFN- $\beta$ : Interferón beta.

IgG: Inmunoglobulina G.

ISR: Ratio del estado inmune.

LB: linfocitos B.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

LMP: proteínas latentes de membrana.

LT: linfocitos T.

LTreg: Linfocitos T reguladores.

MAF: Alelo de frecuencia menor.

MBP: Proteína básica de la mielina.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano.

MOG: Glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos.

MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score.

NABs: anticuerpos neutralizantes del IFN- $\beta$ .

NF- $\kappa$ B: Factor de transcripción nuclear Kappa beta

NK: Células Natural Killer.

NO: Óxido nítrico.

OD: densidad óptica.

PAF: factor activador de plaquetas.

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PML: Leucoencefalopatía multifocal progresiva

rt-PCR: PCR a tiempo real.

RM: Resonancia magnética

SNC: Sistema nervioso central.



SNPs: Polimorfismo de un solo nucleótido.

SSOP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con sonda de oligonucleótidos específica

T: Timina.

Th1: Células T CD4+ helper tipo 1.

Th2: Células T CD4+ helper tipo 2.

Th17: Células T CD4+ helper tipo 17.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

VCA: Antígeno de la cápside del virus de Epstein-Barr.

VCAM-1: Molécula de adhesión vascular tipo 1.

VLA-4: antígeno-4 de activación muy tardío.



## **RESUMEN**



## **RESUMEN**

### **Introducción**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC) que cursa con desmielinización y destrucción axonal en distintos grados.

La etiología de la EM es desconocida aunque parece ser multifactorial. Entre los factores ambientales relacionados, el que más se ha asociado hasta el momento es la infección por determinados virus, entre ellos fundamentalmente el virus de Epstein-Barr (EBV). También se relaciona con factores genéticos como la presencia de determinados alelos del Antígeno leucocitario humano (HLA) y ciertos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

### **Objetivos**

Analizar la posible asociación de los niveles de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA del EBV con diversos factores demográficos y determinadas variables clínicas de pacientes con EM.

Valorar la posible relación de los niveles de dichos anticuerpos en función de los alelos presentes del HLA I y II, así como según la presencia de determinados SNPs relacionados con la enfermedad.

Contrastar las diferencias entre pacientes y controles.

## **Material y métodos**

Se reclutaron muestras de 325 pacientes con EM-RR del Hospital Clínico San Carlos de Madrid tratados con natalizumab, interferón beta (IFN- $\beta$ ) o acetato de glatiramero (AG).

El análisis de los niveles de anticuerpos frente al EBV fue realizado mediante los kits de determinación de IgG de Trinity Biotech Captia™ frente a los antígenos EBNA-1 y VCA, basados en un ensayo inmunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay) ELISA indirecto.

Se recopilaron los datos sobre los alelos HLA-IA, HLA-IB, HLA-II (DQA, DQB y DR) de todos los pacientes del estudio, así como del DRB1\*15:01 tanto de pacientes como de controles. El genotipado de estos alelos se realizó mediante la técnica PCR-SSOP (Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid Probe).

Se obtuvieron los datos referentes a 42 SNPs relacionados con EM de los pacientes. Su genotipado fue realizado a través de PCR a tiempo real (rt-PCR) empleando sondas TaqMan® y mediante el equipo ABI PRISM 7900HT (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante el software IBM© SPSS statistics® para windows, versión 15.0.

## **Resultados y discusión**

No se observó una correlación lineal entre la edad del paciente y los valores de las IgG anti-EBNA-1 ni anti-VCA previos al inicio del tratamiento (coeficiente Rho de

Spearman ( $\rho$ ) de 0,021 y 0,169 respectivamente). Tampoco se halló una correlación entre los valores de anticuerpos frente a estos antígenos y la duración de la enfermedad ( $\rho = -0,126$  para EBNA-1 y  $\rho = 0,073$  para VCA) ni con el MSSS ( $\rho = -0,077$  para el antígeno EBNA-1 y  $\rho = 0,055$  para el VCA).

Se contrastaron las posibles diferencias significativas entre hombres y mujeres en los valores serológicos de los antígenos estudiados, no hallando diferencias entre ambos sexos (p-valor = 0,730 para EBNA-1 y p= 0,131 para VCA).

Considerando las variaciones en los niveles de IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA tras los dos años de tratamiento, no se obtuvo ninguna asociación significativa en relación con los brotes durante el periodo mencionado.

Tampoco se obtuvo ninguna asociación entre la variación de las IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA y la progresión de la enfermedad para los pacientes tratados con AG o IFN- $\beta$ . Por el contrario, se halló una asociación positiva entre los niveles de IgG anti-EBNA-1 y la progresión en los pacientes tratados con natalizumab (p-valor = 0,043).

Se compararon también las variaciones serológicas frente a estos antígenos del EBV en relación con la respuesta a cada uno de los tres tratamientos analizados. No se obtuvo ninguna relación estadísticamente significativa (p= 0.375 para natalizumab, p=0.481 para AG y p=0.350 para IFN- $\beta$ ).

Entre las variantes alélicas estudiadas del HLA-II, se halló que las combinaciones alélicas DQA1\*0102/\*0501 y DQB1\*0301/\*0602 estaban asociadas a valores por encima de la mediana de las IgG anti-EBNA-1 (p= 0,001 y p=0,002 respectivamente). Por el contrario, la combinación alélica DQA1\* 0501/\*0501 se asoció a valores inferiores a la mediana de dichos niveles de inmunoglobulinas anti-EBNA-1 (p=0,015).

Entre los 42 SNPs analizados, se obtuvo una asociación entre la existencia de valores elevados de IgG anti-EBNA-1 y la presencia de los polimorfismos rs11129295, rs12212193 y rs17174870 ( $p=0,013$ ,  $p=0,036$  y  $p=0,035$  respectivamente). En contraposición, el polimorfismo rs1738074 se asoció a valores más elevados d IgG anti-VCA ( $p=0,023$ ).

Al estudiar los parámetros demográficos en comparación con la serología frente al EBV en los individuos control, no se hallaron diferencias significativas ni en función de la edad ni el sexo del individuo, al igual que ocurría con los pacientes con EM.

A diferencia de los pacientes, en los controles se obtuvo una asociación significativa entre los valores más bajos de IgG anti-EBNA-1 y la ausencia del subtipo DRB1\*15:01 ( $p=0,037$ ).

Asimismo, se obtuvieron unos niveles significativamente más elevados de IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA en los pacientes que en los controles ( $p=0,007$  y  $p=0,034$  respectivamente).

### **Conclusiones**

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Los pacientes con EM presentaron unos niveles tanto de IgG anti-EBNA-1 como anti-VCA estadísticamente superiores con respecto a los individuos considerados control.
2. Los valores de las IgG estudiadas previos al inicio de los tres tratamientos considerados, no influyeron en la posterior respuesta del paciente al tratamiento.



3. Los parámetros demográficos sexo y edad, así como los parámetros clínicos duración de la enfermedad y MSSS, no parecen asociarse con las variaciones de los niveles de IgG anti-EBNA-1 ni anti-VCA que presentaron los pacientes con EM a lo largo de los dos años de seguimiento.

4. Nuestros datos apoyan que los brotes ocurridos durante los dos años de tratamiento, no se correlacionan con variación alguna de los niveles de las IgG anti-EBNA-1 ni anti-VCA al finalizar dicho periodo.

5. Los pacientes en tratamiento con natalizumab en los que progresa la enfermedad, presentan valores más elevados de los niveles de IgG anti-EBNA-1 tras los dos años de tratamiento, con respecto a los que no progresa. Por el contrario, los niveles de las IgG anti-EBNA-1 no varían en función de la progresión en los pacientes tratados con AG o IFN- $\beta$ .

6. No existe ninguna asociación entre la progresión o la respuesta al tratamiento y los niveles de IgG anti-VCA para ninguno de los tres tratamientos estudiados.

7. Las combinaciones alélicas HLA-DQA1\*01:02/\*05:01 y DQB1\*03:01/\*06:02 se asociaron estadísticamente a valores más elevados de los niveles de IgG anti-EBNA-1, mientras que la combinación HLA-DQA1\*05:01/\*05:01 se asoció a valores más bajos de las IgG anti-EBNA-1.

8. La presencia del HLA DRB1\*15:01 no se asoció con valores más o menos elevados de las IgG anti-EBNA-1 o anti-VCA en los pacientes con EM.

9. Los SNPs rs11129295, rs12212193 y rs17174870 se asociaron estadísticamente con niveles más elevados de IgG anti-EBNA-1, mientras que el SNP rs1738074 fue asociado a niveles más elevados de IgG anti-VCA.

## **ABSTRACT**



## **ABSTRACT**

### **Introduction**

Multiple sclerosis (EM) is a neurological chronic inflammatory disease of the central nervous system (SNC) characterized by demyelination and axonal destruction in different degrees.

The etiology of the EM is unknown although it seems to be multifactorial. Among the related environmental factors, the one that has most been associated so far is the infection by certain viruses, among them mainly the Epstein-Barr virus (EBV). It is also related to genetic factors such as the presence of certain alleles of the human leukocyte antigen (HLA) and certain single nucleotide polymorphisms (SNPs).

### **Objectives**

To analyze the possible association of anti-EBNA-1 and anti-VCA IgG antibody levels of EBV with various demographic factors and certain clinical variables of patients with MS.

To assess the possible relationship of the levels of said antibodies according to the alleles present in HLA I and II, as well as according to the presence of certain SNPs related to the disease.

Contrast the differences between patients and controls.

## **Material and methods**

Samples were recruited from 325 patients with MS-RR from the San Carlos Clinical Hospital of Madrid treated with natalizumab, interferon beta (IFN- $\beta$ ) or glatiramer acetate (AG).

The analysis of antibody levels against EBV was carried out using the Trinity Biotech Captia <sup>TM</sup> IgG determination kits against the EBNA-1 and VCA antigens, based on an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA).

Data of the HLA-IA, HLA-IB, HLA-II alleles (DQA, DQB and DR) were collected from all patients of the study, as well as DRB1 \* 15: 01 from both patients and controls. The genotyping of these alleles was carried out using the PCR-SSOP (Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probe) technique.

The data referring to 42 SNPs related to MS of the patients were obtained. Its genotyping was performed through real-time PCR (rt-PCR) using TaqMan<sup>®</sup> probes and by the ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

All the data obtained were analyzed using the IBM © SPSS statistics<sup>®</sup> software for windows, version 15.0.

## **Results and Discussion**

No linear correlation was observed between the age of the patient and anti-EBNA-1 or anti-VCA IgG values prior to the start of treatment (Spearman's Rho coefficient ( $\rho$ ) of 0.021 and 0.169, respectively). There was also no correlation between the values of antibodies against these antigens and the duration of the disease ( $\rho$  = -0.126 for EBNA-1 and  $\rho$  = 0.073 for VCA) or with the MSSS ( $\rho$  = -0.077 for the EBNA-1 antigen and  $\rho$  = 0.055 for the VCA).

The possible significant differences between men and women in the serological values of the studied antigens were contrasted, not finding differences between both sexes (p-value = 0.730 for EBNA-1 and p = 0.131 for VCA).

Considering the variations in anti-EBNA-1 and anti-VCA IgG levels after two years of treatment, no significant association was obtained in relation to the relapses during the mentioned period.

No association was found between the variation of the anti-EBNA-1 and anti-VCA IgG and the progression of the disease for patients treated with AG or IFN- $\beta$ . On the contrary, a positive association was found between anti-EBNA-1 IgG levels and progression in patients treated with natalizumab (p-value = 0.043).

It was also compared the serological variations against these EBV antigens in relation to the response to each of the three treatments analyzed. No statistically significant relationship was obtained (p = 0.375 for natalizumab, p = 0.481 for AG and p = 0.350 for IFN- $\beta$ ).

Among the allelic variants studied of HLA-II, it was found that the allelic combinations DQA1\*0102 /\* 0501 and DQB1\*0301/\*0602 were associated with values above the median of anti-EBNA-1 IgG (p = 0.001 and p = 0.002 respectively). In contrast, the allelic combination DQA1\*0501/\*0501 was associated with values below the median of said anti-EBNA-1 immunoglobulin levels (p = 0.015).

Among the 42 SNPs analyzed, an association was obtained between the existence of high values of anti-EBNA-1 IgG and the presence of the polymorphisms rs11129295, rs12212193 and rs17174870 (p = 0.013, p = 0.036 and p = 0.035 respectively). In contrast, the polymorphism rs1738074 was associated with higher values of anti-VCA IgG (p = 0.023).

When studying the demographic parameters in comparison with the serology against the EBV in the control individuals, no significant differences were found neither according to the age nor the sex of the individual, as it happened with the patients with MS.

Unlike the patients, in the controls a significant association was obtained between the lowest anti-EBNA-1 IgG values and the absence of the DRB1 \* 15: 01 subtype ( $p = 0.037$ ).

Likewise, significantly higher levels of anti-EBNA-1 and anti-VCA IgG were obtained in patients than in controls ( $p = 0.007$  and  $p = 0.034$  respectively).

### **Conclusions**

From the results obtained in the present work the following conclusions have been drawn:

1. Patients with MS presented levels of both anti-EBNA-1 and anti-VCA IgG statistically superior with respect to the individuals considered control.
2. The values of the IgG studied before the start of the three treatments considered, did not influence the patient's subsequent response to treatment.
3. The demographic parameters sex and age, as well as the clinical parameters duration of the disease and MSSS, do not seem to be associated with the variations of anti-EBNA-1 or anti-VCA IgG levels that MS patients presented throughout the two years of follow-up.



4. Our data support that the relapses occurred during the two years of treatment, do not correlate with any variation of anti-EBNA-1 or anti-VCA IgG levels at the end of this period.

5. Patients treated with natalizumab in whom the disease progresses have higher values of anti-EBNA-1 IgG levels after two years of treatment, compared to those who do not progress. On the other hand, levels of anti-EBNA-1 IgG do not vary according to progression in patients treated with AG or IFN- $\beta$ .

6. There is no association between progression or response to treatment and anti-VCA IgG levels for any of the three studied treatments.

7. The allelic combinations HLA-DQA1 \* 01: 02 / \* 05: 01 and DQB1 \* 03: 01 / \* 06: 02 were statistically associated with higher values of anti-EBNA-1 IgG levels, while the combination HLA-DQA1 \* 05: 01 / \* 05: 01 was associated with lower values of anti-EBNA-1 IgG.

8. The presence of HLA DRB1 \* 15: 01 was not associated with more or less elevated values of anti-EBNA-1 or anti-VCA IgG in patients with MS.

9. SNPs rs11129295, rs12212193 and rs17174870 were statistically associated with higher levels of anti-EBNA-1 IgG, while SNP rs1738074 was associated with higher levels of anti-VCA IgG.



# **INTRODUCCIÓN**

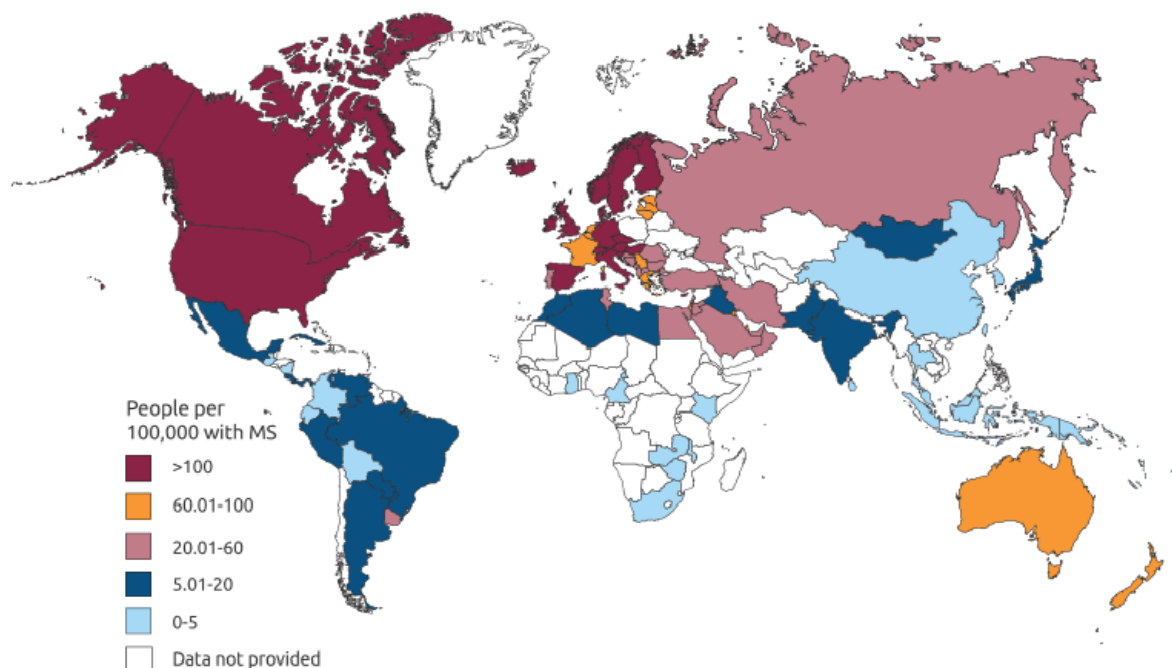


## INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC), que se caracteriza por presentar un proceso autoinmune que provoca desmielinización y lleva consigo un curso degenerativo con destrucción axonal en diferentes grados, pérdida de oligodendrocitos y astrogliosis(1) (2)(3).

### 1. Epidemiología

La EM afecta a 2,3 millones de personas en el mundo. La prevalencia más alta de la enfermedad es en América del Norte y Europa (140 y 108 casos por 100.000 personas, respectivamente) mientras que existe una prevalencia menor en África subsahariana y el Este de Asia (con tasas de 2,1 y 2,2 por 100.000 personas). (4)



**Figura 1.** Prevalencia de la EM en el año 2013. Extraído del Atlas de la esclerosis múltiple 2013.(4)

Es una de las principales causas de discapacidad neurológica en adultos jóvenes en los países occidentales, con una media de edad de aparición de los síntomas entre 25 y 33 años, aunque entre un 2-5% de los casos de EM se diagnostican en individuos menores de 18 años.(5)

El predominio de la enfermedad es diferente en mujeres que en hombres, con un ratio mujer: hombre que ha pasado de 2:1 a 3:1 en los últimos años. La razón de la mayor prevalencia en mujeres no se conoce, aunque se cree que puede estar relacionada con una compleja interacción de las hormonas sexuales, sus metabolitos y precursores con el sistema inmune (6). El aumento del ratio en los últimos años podría deberse a factores ambientales relacionados con el incremento del hábito tabáquico en mujeres, ocupaciones, control de la natalidad, maternidad tardía etc (7)(8).

Asimismo, en los últimos años los estudios más recientes, han dado un cambio a la visión de la teoría del efecto latitudinal sobre la prevalencia de la EM, tan aceptada desde hace años. Entre los motivos propuestos en dichos estudios se encuentran las mejoras higiénicas en poblaciones del sur, que han llevado a una menor infestación por helmintos y por tanto una reducción del efecto protector de los mismos (9), las infecciones más tardías frente a virus relacionados positivamente con el riesgo de EM como es el virus de Epstein-Barr (EBV) entre otros, y la disminución del gradiente norte-sur en cuanto a los niveles de vitamina D por cambios en el estilo de vida que implican menor exposición solar, reduciendo el efecto en zonas del sur y con alimentos enriquecidos en Vitamina D en zonas del norte. Todas estas razones entre otras, parecen haber reducido las diferencias de prevalencia de la enfermedad según la latitud, existentes anteriormente (8) (10) (11) (12).

## **2. Etiopatogenia**

La EM es una patología de causa desconocida hasta el momento, aunque los numerosos estudios realizados indican un origen multifactorial en el que estarían implicados varios factores ambientales y genéticos que actuando en conjunto aumentarían la susceptibilidad a padecer la enfermedad y podrían ser responsables de la gran variabilidad de esta enfermedad.

### **2.1 Factores ambientales**

#### **2.1.1 Efecto latitudinal y exposición solar**

Los estudios migratorios han demostrado las diferencias en el riesgo de padecer la enfermedad cuando se migra en edades tempranas, desde zonas de bajo riesgo a zonas de alto riesgo de la enfermedad, adquiriendo el de la nueva zona. Esto implica que existen factores ambientales que actúan en los primeros años de vida, fundamentalmente antes de la adolescencia (13)(14).

Dichas zonas de mayor o menor riesgo han sido constatadas en los estudios latitudinales, diferenciando las zonas más alejadas del ecuador como zonas de mayor riesgo (15).

Las diferencias latitudinales se asocian con diferente exposición solar, habiéndose encontrado una asociación negativa entre la exposición solar, antes de la adolescencia, y el riesgo de la enfermedad. La exposición solar (independientemente de la formación de Vitamina D) parece estar relacionada, según algunos estudios, con una supresión de la respuesta inmune(16) (17). Tras la absorción de fotones UVB, algunas moléculas como el ácido trans-urocánico (UCA) en el estrato córneo, lípidos y proteínas

de las células de la epidermis, oxidados por la radiación UV pueden iniciar distintas vías de señalización que favorecen la liberación de mediadores solubles como la IL6, IL10, factor activador de plaquetas (PAF) o TNF, que contribuyen en la inmunorregulación (18).

### **2.1.2 Vitamina D**

Además del propio efecto de la exposición solar a la radiación ultravioleta B mencionada, dicha radiación también está implicada en la síntesis de la vitamina D<sub>3</sub> en los queratinocitos de la piel a partir del 7-dehidrocolesterol. Esta vitamina tras su modificación por hidroxilación en el hígado y posteriormente en el riñón, se convierte en la forma activa 1,25 dihidroxyvitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH) D<sub>3</sub>)(19).

La vitamina D tiene diversas funciones entre las que se encuentra la regulación de la respuesta inmune y diferenciación de las células del sistema inmunitario. Tiene la capacidad de incrementar el número de células T reguladoras y su función supresora. Puede modular la expresión de moléculas coestimuladoras producidas por las células dendríticas disminuyendo la secreción de citoquinas proinflamatorias y reduciendo la actividad de los Linfocitos Th1. (18)(20).

Por todos estos motivos, la vitamina D juega un papel importante en la EM. No obstante, aún no se sabe si los bajos niveles de Vitamina D en pacientes con EM, son una de las múltiples posibles causas o una consecuencia de la enfermedad, como apoyan algunos estudios, según los cuales podría ser un efecto del cambio de comportamiento en estos pacientes que evitan la exposición solar por el efecto negativo sobre los síntomas de la enfermedad, o bien sugieren, que la enfermedad podría estar actuando sobre el metabolismo de la vitamina D.(21)



Se ha relacionado también el mes de nacimiento con el riesgo de padecer la enfermedad, viéndose que existe un mayor riesgo entre los individuos nacidos en Mayo y un menor riesgo entre los nacidos en Noviembre, en los pacientes que se encuentran en el hemisferio Norte (en el hemisferio Sur ocurre al contrario). Esto parece estar relacionado con los niveles de Vitamina D disponibles para el feto durante el embarazo, siendo más altos en los nacidos en otoño por la exposición solar durante el verano (22).

La vitamina D también ha sido vinculada, según algunos autores, con un menor riesgo de EM a través del estado de protección que podría tener frente a algunas infecciones como la provocada por el EBV. Según esta hipótesis, la vitamina D favorece la síntesis de la Catelicidina humana (LL-37), que tiene un efecto protector contra diversos patógenos entre ellos el EBV(23)(24).

### **2.1.3 Tabaco.**

El hábito tabáquico también está ligado al incremento del riesgo de padecer EM, al igual que otras enfermedades autoinmunes (25)(26). A su vez, se ha visto una asociación entre el tabaquismo, fundamentalmente cuando comienza a edades tempranas, con el empeoramiento del pronóstico de esta enfermedad. En estos casos, el desarrollo de la forma progresiva de EM ocurre con anterioridad una vez que se manifiesta la patología(27).

Algunas de las teorías que relacionan el tabaquismo y la EM se basan en el posible efecto de alguno de los componentes del tabaco como el óxido nítrico (NO), el tiocianato o la acroleína.

El NO es uno de los componentes del humo del tabaco aunque también se sintetiza en el organismo en condiciones normales (28). En concentraciones fisiológicas tiene un efecto neuroprotector, pero a altas concentraciones es neurotóxico provocando daño fundamentalmente en los oligodendrocitos (29)(30)(31). Este efecto neurotóxico

se pone de manifiesto en diversos estudios, en los que determinando los niveles de los metabolitos del óxido nítrico se ha visto que se encuentran elevados en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM durante los brotes de la enfermedad y en los pacientes con progresión de la misma (32).

En modelos animales de EM, como es la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE), se ha encontrado un incremento en los niveles de acroleína en ratones con déficit motor que podría estar actuando a nivel de la vaina de mielina provocando la destrucción de lípidos y proteínas (33).

Estas sustancias son algunas de las que se barajan como neurotóxicas y dada su presencia en el tabaco podrían contribuir en el riesgo y progresión de la enfermedad.

Recientemente se ha demostrado el aumento del riesgo de EM cuando se asocia el hábito tabáquico con niveles elevados de anticuerpos frente al antígeno nuclear del EBV (EBNA). Según esta teoría puede existir una vía biológica común entre algún componente del tabaco y la respuesta inmune frente a la infección por el EBV(34).

#### **2.1.4 Otros factores**

En algunos estudios se ha relacionado la obesidad, durante la adolescencia, con un mayor riesgo de padecer la enfermedad. Las hipótesis que tratan de explicar esta asociación se basan en los niveles bajos de vitamina D que presentan las personas con obesidad, o bien, relacionan la leptina e interleuquina 6, secretadas por el tejido adiposo, con la reducción de la actividad de los linfocitos T reguladores (LTreg) (35).

Muy pocos estudios han encontrado asociación entre la enfermedad y la exposición ocupacional a determinadas sustancias químicas, radiación, gases tóxicos, etc (36), al igual que la asociación entre lesiones traumáticas en cabeza o columna vertebral y el comienzo de la enfermedad o empeoramiento de la misma. Esta teoría se ha basado en una posible destrucción en la barrera hematoencefálica (BHE) que podría

permitir un incremento del paso de células periféricas del sistema inmune al SNC, pero no ha sido demostrada con certeza hasta el momento (37).

### **2.1.5 Infecciones virales**

Existen dos teorías basadas en las infecciones virales que tratan de explicar la epidemiología de la EM:

- La hipótesis de la higiene: postula que el contacto o infección a edades tempranas con el agente patógeno protege frente al riesgo de desarrollar la EM, pero contactos o infecciones posteriores (infancia tardía-adolescencia) con el mismo agente, supondría un mayor riesgo de padecer la enfermedad. Esto explicaría la alta prevalencia de EM en las zonas con un nivel socioeconómico mayor.
- La hipótesis de la prevalencia: indica que la EM es causada por un patógeno que es más frecuente en las zonas donde la prevalencia de dicha enfermedad es mayor. Dicho patógeno generaría una infección asintomática en la mayoría de los casos y sólo en algunos produciría años después de la primoinfección los síntomas neurológicos de la enfermedad (14).

Se han relacionado gran cantidad de virus con la EM (Tabla1). De todos ellos, los que más consideración se les ha dado a lo largo de diferentes estudios han sido el EBV, el Herpesvirus Humano 6 (HHV6) y los retrovirus endógenos humanos (HERVs).

<b>Familia</b>	<b>Virus</b>
<b><i>Herpesviridae</i></b>	Herpes simples virus (HSV) Varicella zoster virus (VZV) Epstein-Barr virus (EBV) Herpesvirus Humano 6 (HHV-6) Virus de la enfermedad de Marek (MDV)
<b><i>Retroviridae</i></b>	Virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) Retrovirus endógenos humanos (HERV-K, HERV-H, HERV-W)
<b><i>Paramyxoviridae</i></b>	Sarampión Paperas Virus de la Parainfluenza tipo 1 Virus del moquillo canino Virus de los simios tipo 5
<b><i>Coronaviridae</i></b>	Corona virus
<b><i>Papovaviridae</i></b>	JC virus
<b><i>Bornaviridae</i></b>	Virus de la enfermedad de Borna

**Tabla 1.** *Virus asociados a la EM (38)*

El mecanismo por el que los patógenos pueden estar relacionados con la EM no se conoce con certeza, pero hay varias teorías que tratan de explicarlo en términos generales.

- La teoría del Hit-Hit propone que el patógeno infecta el SNC y por tanto la desmielinización puede ser una consecuencia directa de la infección, habiendo o no desarrollo de autoinmunidad.
- Otra de las teorías es la del Hit-Run, que postula que la infección primaria en la periferia desencadena una reacción autoinmune órgano-específica crónica, sin necesidad de que el virus penetre en el SNC.(39)

#### **2.1.5.1 Herpesvirus**

La familia *Herpesviridae* está constituida por un grupo de virus ADN que establecen infecciones latentes con reactivaciones ocasionales, tras la infección primaria que ocurre durante la niñez fundamentalmente (40).

Estos virus han sido muy estudiados en relación con la EM dado que muchas de sus cualidades les hacen candidatos de interés en relación con la patología. Entre estas características se encuentran el infectar de forma persistente el SNC, producir infecciones con latencia- reactivación similares a las formas remitente-recurrente de la enfermedad, etc.

Existen distintos mecanismos que tratan de explicar la forma que tienen estos virus de desencadenar fenómenos autoinmunes.

Mecanismo de la activación inespecífica (bystander activation):

Se basa en que durante una infección viral existe activación de células T a través de citoquinas proinflamatorias en ausencia de estímulo específico para el receptor TCR, por lo que estas células T no entran en los mecanismos de regulación de la tolerancia tanto central como periférica. Estos linfocitos T autorreactivos están presentes en la inmunidad de individuos sanos donde carecen de relevancia, pero tiene un efecto importante en la enfermedad autoinmune(39)(41)

Mecanismo del mimetismo molecular:

Según esta teoría algunos péptidos virales presentan epítomos con cierta similitud estructural a la de diversas proteínas del propio organismo, por lo que pueden activar linfocitos T autorreactivos desencadenando una respuesta cruzada frente a antígenos propios. Las células T sensibilizadas tienen un umbral más bajo de activación y pueden reaccionar frente a los autoantígenos que previamente no atacaban (42).

Algunos estudios indican que esta reactividad cruzada que presentan ciertos linfocitos T puede deberse a la degeneración del reconocimiento antigénico por parte del TCR que solamente necesitaría unos pocos residuos críticos. (39)

Los péptidos de los autoantígenos son presentados por las células presentadoras de antígenos (APC) a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I y II (MHCI y MHCII) a linfocitos T CD8+ y CD4+ autorreactivos (43).

La proteína básica de la mielina humana (MBP) es uno de los componentes de la mielina y uno de los autoantígenos que más se ha relacionado con la EM a través del mimetismo molecular. Existe una homología estructural entre los residuos 83-99 de la MBP y los residuos 627-641 de la ADN polimerasa del EBV. También se ha encontrado una homología entre la proteína U24 de las variantes A y B del HHV-6 (residuos 4-10) con los residuos 96-102 de la MBP(44).

#### **2.1.5.1.2 EBV o Herpesvirus humano 4.**

Es un virus que puede infectar células epiteliales pero fundamentalmente infecta a linfocitos B (LB) en reposo provocando su activación y proliferación. Contacta con dicho LB a través de la unión al CD21 mediante la glicoproteína gp350 de la envuelta del virus (45) y con el MHCII a través de la gp42 viral (46)(47).

La forma activa del virus se encuentra en el sistema linfoide nasofaríngeo mientras que la forma latente permanece en los LB memoria en sangre periférica, pudiendo reactivarse por causas desconocidas, frecuentemente en individuos inmunosuprimidos, con la consecuente liberación de virus infectivos de nuevo.

En personas inmunocompetentes los Linfocitos T citotóxicos y las células NK controlan la proliferación de las células infectadas durante la infección primaria, aunque no siempre consiguen la erradicación del virus que permanece en baja concentración en un estado latente en muchos individuos (48).

El EBV suele provocar una infección asintomática y benigna en la mayoría de los casos. En torno al 95% de la población adulta posee anticuerpos frente al virus, pero

en ocasiones dependiendo de factores ambientales y genéticos puede contribuir a la aparición de varias enfermedades como: Mononucleosis infecciosa, Linfoma de Burkitt, Carcinoma nasofaríngeo, Linfoma inmunoblástico y Enfermedad de Hodgkin (49).

Durante la infección latente el EBV expresa algunas proteínas virales como los antígenos nucleares (EBNA) que contribuyen a mantener el material genético del virus en forma de episomas en el núcleo de la célula infectada separados del ADN celular, así como otras proteínas latentes de membrana (LMP) algunas de las cuáles LMP1 y LMP2A simulan el efecto de la activación de los receptores CD40 y BCR del Linfocito B permitiendo su activación, proliferación y maduración hacia LB memoria independientemente de los Linfocitos T (50). También se expresa RNA viral (EBER) etc (51).

Cuando por alguna razón se activa el ciclo lítico del virus en los LB infectados, comienza la replicación del ADN viral, la producción de glicoproteínas estructurales entre las que se encuentra el antígeno de la cápside (VCA) y la muerte de la célula infectada con la liberación de los viriones que pueden infectar a otros LB (52).

#### Respuesta humoral en los ciclos lítico y latente del virus:

Uno de los antígenos EBNA que se expresa durante el ciclo latente es el EBNA-1. Esta proteína se une a una secuencia del propio EBV denominada oriP que permite la asociación a los cromosomas durante la mitosis para permitir la permanencia del genoma del virus tras la división de la célula. Posee una estructura repetida glicina-alanina que impide su propia degradación por parte del proteasoma celular, y por tanto no es escindida en péptidos que serían presentados por las moléculas HLA-I a los Linfocitos T citotóxicos. Este mecanismo permite al virus mantenerse en la célula infectada al no ser destruida por los LT citotóxicos (51).

Los anticuerpos frente al antígeno EBNA-1 suelen aparecer en suero a partir de los 3 o 4 meses posteriores a la infección por el EBV y mantenerse normalmente a bajos niveles de por vida (52).

Durante las etapas tardías del ciclo lítico se expresa fundamentalmente el antígeno VCA. La respuesta humoral frente a este antígeno puede detectarse al comienzo de la infección a través de la aparición de IgM e IgG frente al VCA. Las IgM, aunque suelen detectarse al mismo tiempo que las IgG, en ocasiones se elevan con anterioridad, pero se mantienen elevadas en suero durante unas 4 semanas (hasta 3 meses máximo) haciéndose posteriormente indetectables. Por su parte los niveles de IgG frente a VCA se mantienen elevados unos meses y luego descienden pero se mantienen presentes de por vida. Ante una posible reactivación del virus los anticuerpos que se detectan son por tanto IgG-VCA en lugar de IgM-VCA (52) (53).

#### EBV en relación con la EM:

El EBV ha sido objeto de múltiples estudios en los que se ha relacionado con la EM. Se han encontrado niveles más altos de IgG frente a antígenos como el EBNA-1, EBNA-2, VCA, etc, tanto en suero como en Líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con la enfermedad que en controles (54)(55).

También se ha detectado presencia de células con RNA viral (EBER) en la sustancia blanca de pacientes con lesiones activas, en las cuales existe sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias como el IFN $\alpha$ , mientras que no se han encontrado células EBER+ en tejido cerebral o en LCR de los controles estudiados ni de pacientes con EM sin lesiones activas o fuera de las regiones desmielinizadas. Se considera así, que el EBV puede estar implicado en la neuroinflamación(56) (57) relacionada con la EM pero



no con otras enfermedades neurológicas inflamatorias como meningitis micóticas, encefalopatías virales, vasculitis cerebral etc (58).

Asimismo, otro estudio (59) demostró la existencia de una asociación entre la medida de inmunoglobulinas frente al EBNA-1 y la región HLA del genoma humano que contiene información para la función inmune.

Además de un mayor riesgo de padecer EM, se ha visto también que el EBV podría estar relacionado con recaídas durante la enfermedad, durante las cuáles se ha detectado una mayor replicación viral (60).

## **2.2 Factores genéticos**

La agregación familiar es un fenómeno que ha sido muy estudiado en relación con la EM. Diversos estudios han encontrado un riesgo entre 12-40 veces mayor de padecer la enfermedad en personas con parientes de primer grado afectados de EM que en el resto de la población, y 3 veces mayor con parientes de segundo grado que presentan la enfermedad(61) (62).

Dicho riesgo ronda el 2-5% al tener un hermano o gemelo dizigótico afectado, mientras que es mucho mayor en el caso de los gemelos monozigóticos (alrededor del 18%)(63).

Todo ello pone de manifiesto la existencia de una herencia genética, pero no se corresponde con una herencia mendeliana sino una herencia compleja en la que intervienen distintos genes así como la interacción con otros factores, como puede deducirse de los estudios en los que existe discordancia entre los gemelos monozigóticos en cuanto a la aparición de la enfermedad, o bien diferentes riesgos en distintas localizaciones geográficas de familias con similares características genéticas

(61).

Se han estudiado muchos genes con respecto a la EM, pero la mayor asociación ha sido con el Antígeno leucocitario humano (HLA) perteneciente al MHC del cromosoma 6p21, fundamentalmente los locus HLA-DRB1, HLA-DQB1 y DQA1 del HLA de clase II (64)(65), siendo el DRB1\*15:01 el más asociado con la enfermedad (66)(67).

Asimismo, también se ha relacionado en algunos estudios, aunque en menor medida, el HLA I con el riesgo de padecer EM. La presencia del alelo HLA-A\*0301 incrementa el riesgo de la enfermedad 2.1 veces con independencia de los alelos DRB1\*15 y DQB1\*06 (DRB1\*1501, DRB5\*0101, DQA1\*0102, DQB1\*0602), mientras que el HLA-A\*0201 supone una disminución de 0.52 veces de dicho riesgo, al mismo tiempo que reduce el riesgo que suponen los alelos DRB1\*15, DQB1\*06 de 3,6 veces a 1,5 (68).

Por otra parte, estudios actuales de asociación del genoma completo (GWAS) han descubierto 110 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en 103 loci fuera del MHC, asociados también en mayor o menor medida a la enfermedad, y que suponen un 20% de la heredabilidad de la EM, que sumados a las variaciones en el MHC alcanzaría el 28%(69). Muchos de estos SNPs están relacionados con la regulación de la respuesta inmune a través de la actuación sobre el desarrollo y activación de LT, citoquinas u otras proteínas supresoras o estimuladoras de la inmunidad (70), mientras que otros influyen sobre la respuesta a determinados factores ambientales como la vitamina D (71).

### **2.2.1 Epistasis**

La baja heredabilidad genética de la enfermedad se debe en parte a la influencia de los factores ambientales pero también al fenómeno de la epistasis, que consiste en las

interacciones entre distintos genes que pueden alterar la expresión de los genes implicados y llevar consigo efectos distintos de aumento o disminución del riesgo de EM cuando se presentan determinados haplotipos en un genoma.

Ejemplos de estas interacciones son además de las comentadas anteriormente para el HLA-I, las que ocurren entre haplotipos del HLA-II-DRB1. El HLA-DRB1\*08 incrementa el riesgo de EM pero cuando se asocia al HLA-DRB1\*15 duplica el riesgo que supone el tener una copia del alelo HLA-DRB1\*15. El efecto protector de los alelos HLA-DRB1\*01 y HLA-DRB1\*10 también se ve potenciado en presencia del HLA-DRB1\*15 (72) (73).

Todas éstas y otras interacciones génicas implican determinados efectos, algunos de ellos ya conocidos y otros por determinar, que en su conjunto hacen variar la forma en la que un determinado gen actúa sobre la EM.

### **2.3 Mecanismo inmunológico de la enfermedad.**

La EM suele comenzar con una reacción inflamatoria aguda que provoca la ruptura de la BHE causando un daño en el SNC.

Estas lesiones agudas son desencadenadas por los linfocitos T CD4+ helper tipo 1 (Th1) autorreactivos, pero más recientemente se ha visto que también están implicados los LT CD4+ Th17 a través de algunas de las citoquinas proinflamatorias que liberan, como la IL17. Dicha citoquina estimula los fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, macrófagos etc, que liberan sustancias desencadenantes de la inflamación como la IL6, metaloproteasas o Factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) entre otras (74).

Los LT en la EM reaccionan frente a distintos autoantígenos como la MBP mencionada anteriormente por su relación con la hipótesis del mimetismo molecular, y que es uno de los principales antígenos que han sido estudiados, pero también existen otros como la Proteína Proteolipídica (PLP) que es la más abundante de las proteínas de la mielina en el SNC (75) o la Glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) (76) entre otros.

En estudios sobre ratones con EAE se ha visto que tras la transferencia de LT autorreactivos a éstos, se produce la activación y proliferación de células de la microglía del SNC, antes del comienzo de los síntomas. Dicha activación antecede a la migración de los monocitos y macrófagos de la periferia al SNC, que suponen el comienzo de los primeros síntomas de la enfermedad. La activación y proliferación de las células de microglía lleva consigo un incremento en la presentación de antígenos a LT y todo ello supone la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL1 $\beta$ , IL6 o TNF $\alpha$ , radicales libres como el NO o la producción de glutamato que contribuye al daño axonal propio de la EM (77), desencadenando el comienzo de las lesiones en el SNC que supondrán el inicio y progreso de la enfermedad, aunque los mecanismos por los que se activan dichas células de microglía por el momento se desconocen(78).

Por otra parte, el papel de los LB en la EM continúa siendo menos claro que el de los LT, aunque distintas líneas de investigación demuestran que tanto LB reactivos frente a la mielina, como células plasmáticas y los anticuerpos que generan, contribuyen al desarrollo y progresión de la enfermedad. Todos ellos se han encontrado en mayor número en las zonas de lesión dentro del SNC, y se ha visto que los síntomas empeoran cuando se transfieren dichos anticuerpos a ratones con EAE (79).

## **2.4 Formas clínicas de la enfermedad**

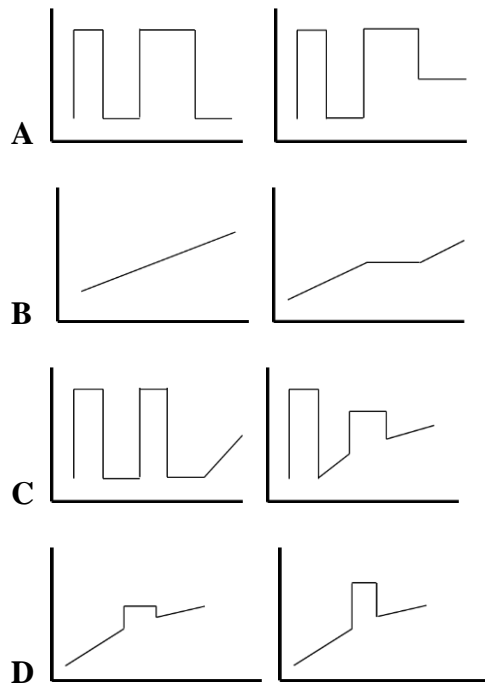
La EM tiene un curso variable dependiendo del paciente, pero existen cuatro tipos principales.

Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente (EM-RR): (83-90% de los casos) cursa con brotes de la enfermedad seguidos de periodos de recuperación variable de la discapacidad. El curso de la enfermedad es estable entre los brotes.

Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva (EM-PP): (10% de los casos) la enfermedad progresa desde el comienzo con pequeñas fluctuaciones pero sin brotes.

Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva (EM-SP): (50% de los casos de EM-RR a los 10 años) curso de la enfermedad Remitente-Recurrente, con o sin brotes ocasionales, pero con recuperación menor de la discapacidad y por tanto cierto empeoramiento progresivo.

Esclerosis Múltiple Progresiva-Recurrente (EM-PR): la enfermedad progresa desde el comienzo pero existen brotes con o sin recuperación completa. Entre las recaídas la enfermedad continúa progresando.(80)(81)(82)



**Figura 2:** (A) *EM-RR*, (B) *EM-PP*, (C) *EM-SP*, (D) *EM-PR*

## 2.5 Clínica

La EM suele comenzar con alteración de la sensibilidad (parestias o acorchamiento de miembros), alteraciones motoras con pérdida de fuerza, neuritis óptica, diplopía, disfunción del tronco cerebral (disartria, disfagia, parálisis facial o vértigo), signo de Lhermitte, fatiga, etc.

Según los criterios de McDonald se define como brote de la enfermedad a la aparición de signos o síntomas de un evento inflamatorio agudo desmielinizante en el SNC, en ausencia de fiebre o infección, de más de 24 horas de duración (83).

Dichos síntomas pueden empeorar gradualmente a lo largo de la enfermedad, llevando a un deterioro cognitivo (afectación de la memoria reciente, lenguaje o razonamiento,) pérdida visual, depresión, alteración de los esfínteres, etc. (82) (84)

## **2.6 Tratamientos**

El tratamiento estándar de la EM se basa en una terapia sintomática (de la depresión, fatiga, movilidad, dolor etc) (84), mientras que los brotes de la enfermedad son tratados con glucocorticoides, o bien plasmaféresis en los casos de brotes más agresivos que no responden a los glucocorticoides (85).

Asimismo, existen otros tratamientos modificadores de la enfermedad que tratan de reducir la aparición de brotes, la progresión de la discapacidad o el número de lesiones activas vistas por Resonancia Magnética (RM).

Estos tratamientos se clasifican según el momento de la enfermedad en que son administrados.

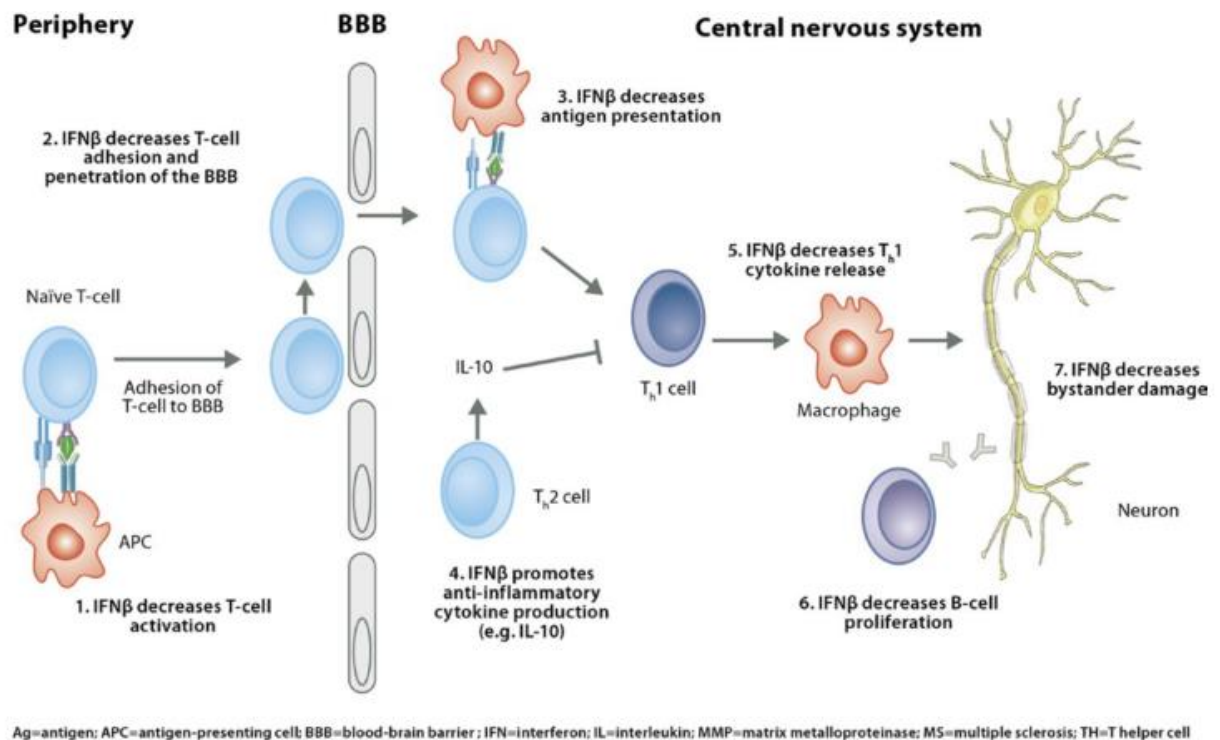
Los tratamientos de primera línea para la EM-RR incluyen interferón beta (IFN- $\beta$ ) (Rebif®, Betaferon®, Extavia®, Avonex® y Plegridy®), acetato de glatiramero (Copaxone®), teriflunomida (Aubagio®) y dimetil fumarato (Tecfidera®). En los pacientes tratados con estos fármacos que tienen una intolerancia o una respuesta subóptima, o bien aquéllos que presentan una EM de curso agresivo, se emplean los tratamientos de segunda línea. Entre estos tratamientos de segunda línea se encuentran natalizumab (Tysabri®), fingolimod (Gilenya®), ocrelizumab (Ocrevus®), y cladribina (Mavenclad®), pasando ya a los de tercera línea en los pacientes que no responden a los anteriores, como alemtuzumab (Lemtrada®) o mitoxantrona (Novantrona®) (aunque ésta última prácticamente no se usa actualmente)(86).

La forma de EM-SP se suele tratar con IFN $\beta$ -1b o con mitoxantrona (87) (88). Otro fármaco para el tratamiento de la EM-SP recientemente aprobado en marzo de 2019 por la Administración de medicamentos y alimentos (FDA) de Estados Unidos, es siponimod (Mayzent®).

Según sus propiedades, estos fármacos se pueden clasificar en:

- Fármacos inmunomoduladores: IFN- $\beta$  y acetato de glatiramer (Copaxone®).

El mecanismo de acción concreto del IFN- $\beta$  se desconoce, aunque se sabe que actúa reduciendo la proliferación celular y la capacidad de presentación antigénica. También consigue reducir la entrada de LT a través de la barrera hematoencefálica al SNC, por medio de la interacción en la adhesión molecular e inhibiendo la producción de metaloproteasa 9 (MMP9) (89) (Figura 3).



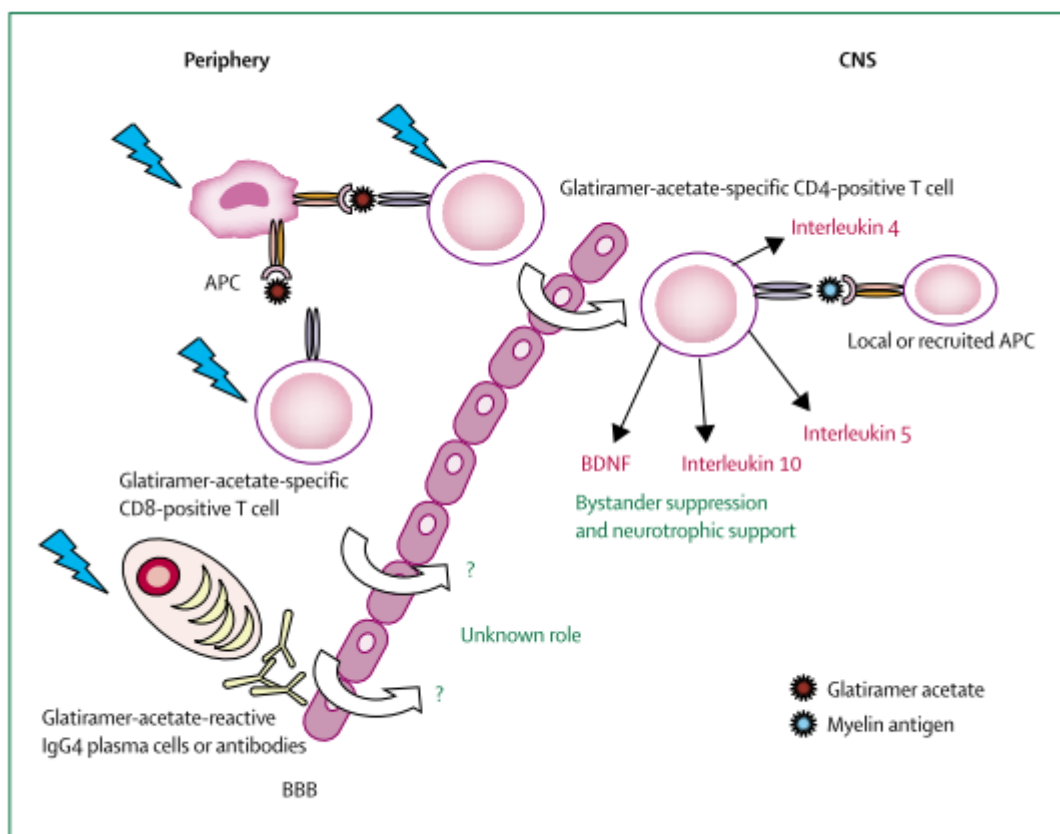
**Figura 3.** Mecanismo de acción de IFN- $\beta$ . Imagen extraída de C. Madsen (90).

Asimismo, se ha visto en algún estudio (91) que el Interferón beta-1a subcutáneo (Rebif ®) disminuye además la progresión de la discapacidad y que al igual que el IFN- $\beta$ -1b subcutáneo (Betaferon® y Extavia®) (recombinante no glicosilado del IFN- $\beta$ )(92) reducen la tasa de brotes en pacientes con EM-RR entre un 27-33% respecto al placebo. Dicha reducción también se observa con el IFN- $\beta$ -1a intramuscular (Avonex®)



aunque la tasa de reducción es en torno al 18% (93). En el caso de la variante pegilada del IFN- $\beta$ , perginterferón (IFN- $\beta$ -1a) comercialmente (Plegridy®), la reducción de la tasa de brotes está en torno al 36% y la reducción de la discapacidad alrededor del 38% (90).

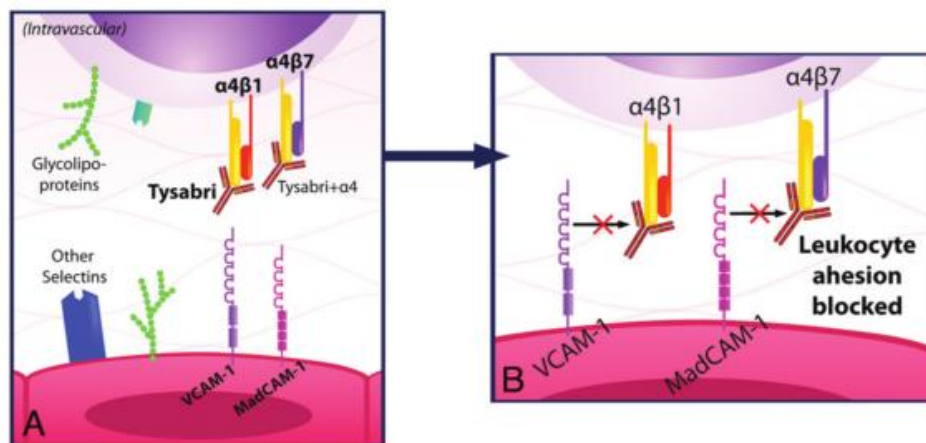
Por su parte acetato de glatiramero (AG), antiguamente conocido como Copolímero-1, es una mezcla de polipéptidos sintéticos que contiene L-ácido glutámico, L-Alanina, L-Lisina y L-Tirosina. Su mecanismo de acción específico no es del todo conocido pero se cree que actúa promoviendo la producción de citoquinas procedentes de las células T CD4+ helper tipo 2 (LTh2), compete con la MBP por su presentación por parte de las moléculas del MHCII impidiendo la activación de LT específicos e induce la activación de LT supresores (94) (figura 4).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de AG. Imagen extraída de C. Farina et al (95).

- Fármacos que inhiben la función linfocitaria: natalizumab (Tysabri®).

Es un anticuerpo monoclonal cuyo mecanismo de acción exacto se desconoce por el momento, al igual que ocurre con los fármacos inmunomoduladores, pero se cree que actúa uniéndose a las subunidades  $\alpha 4$  de la  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  integrinas. Estas integrinas componen el antígeno-4 de activación muy tardío (VLA-4) de la superficie de los leucocitos salvo de neutrófilos. Impide así, la interacción de los leucocitos con las moléculas de adhesión vascular tipo 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión celular adreína de la mucosa vascular tipo 1 (MadCAM1) situadas en las células endoteliales vasculares, y por tanto la trans migración de leucocitos hacia el tejido parenquimático inflamado del cerebro a través de la barrera hematoencefálica (figura 5) (96).



**Figura 5.** Mecanismo de acción de natalizumab. Imagen extraída de D.T.

*Selewski (97).*

Su tasa de reducción de brotes está en torno al 66%, aunque se han detectado múltiples casos de Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (PML) en pacientes tratados con este fármaco (98)(99).

El riesgo de padecer PML depende de la infección previa por el virus JC (100), la duración del tratamiento y el haber estado anteriormente bajo tratamiento con inmunosupresores. Todo ello hace que en pacientes con anticuerpos positivos frente al

virus JC que no han sido tratados previamente con terapia inmunosupresora tengan un riesgo de padecer PML de 1 de cada 1000 pacientes si han sido tratados con natalizumab entre 1-24 meses, 5 de cada 1000 pacientes si han sido tratados entre 25-48 meses, y 6:1000 con duración del tratamiento de 49-72 meses.

Por el contrario, siendo también seropositivos frente al virus JC pero habiendo tenido un tratamiento previo a natalizumab con terapia inmunosupresora, el riesgo aumenta hasta valores de 2:1000 pacientes con duración del tratamiento de 1-24 meses, 11:1000 con tratamiento entre 25-48 meses y 9:1000 tratados entre 49 y 72 meses con natalizumab (101).

- Fármacos con propiedades inmunosupresoras: fingolimod (Gilenya®), alemtuzumab (Lemtrada®), teriflunomida (Aubagio®), mitoxantrona (Novantrona®), siponimod (Mayzent®), ocrelizumab (Ocrevus®) y cladribina (Mavenclad®).

Fingolimod, también conocido como FTY720, fue el primer fármaco vía oral para tratar la EM-RR (2)(102). En su forma fosforilada es un agonista de cuatro receptores de la esfingosina-1fosfato (S1P) de la superficie de los linfocitos(103), impidiendo la salida de estos linfocitos T de los órganos linfoides secundarios hacia el SNC fomentando a su vez, gracias a su capacidad para atravesar la BHE, la remielinización y neuroprotección (104)(105).

Alemtuzumab, es un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno CD52 presente en la superficie de los timocitos, células NK y linfocitos T y B, que parece estar relacionado con su migración y estimulación. También activa mecanismos de apoptosis dependiente de caspasas que contribuirían a la depleción de linfocitos (106) .

Teriflunomida es un fármaco oral (107) que bloquea la síntesis de novo de

pirimidinas, a través de la inhibición reversible del enzima mitocondrial dihidroorotato deshidrogenasa expresado en altos niveles en LB y LT proliferantes (108).

Mitoxantrona debido al pequeño tamaño de su molécula puede atravesar la BHE y actuar sobre el SNC. Impide la proliferación de los linfocitos T y B inhibiendo la replicación y transcripción del ADN al intercalarse en éste. También disminuye la secreción de citoquinas proinflamatorias e induce apoptosis de macrófagos (109)(110).

Siponimod, también conocido como BAF312, es un análogo estructural de la esfingosina que es un esfingolípido endógeno cuya forma bioactiva es la S1P y está relacionada con funciones como el tráfico de linfocitos entre otras. Existen distintos receptores para la S1P y concretamente el S1PR1 es el que se encuentra sobre la superficie de los linfocitos. Dicho receptor es necesario para el movimiento de los LT y LB desde los órganos linfoides secundarios hacia los tejidos. Siponimod tras fosforilarse in vivo puede antagonizar el efecto sobre el S1R1 sin actuar sobre otros receptores como el S1PR3 de los cardiomicocitos, a diferencia de fingolimod. De esta forma siponimod evita los peligrosos riesgos cardíacos de fingolimod y al mismo tiempo tiene una semivida menor para una más rápida eliminación una vez interrumpido el tratamiento (111).

Ocrelizumab, es un anticuerpo monoclonal que se une al CD20 expresado fundamentalmente en la superficie de los LB desde el estado de pre-linfocito hasta la forma madura, aunque también sobre algunos LT (112). Las células plasmáticas no expresan el CD20 por lo que no afecta a la producción de anticuerpos frente a patógenos. Tras unirse al CD20, ocrelizumab reduce el número y actividad de los LB al inducir apoptosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento(113) (114). Tras su reciente aprobación por la EMA en Enero de 2018, es empleado para el

tratamiento de la EM-RR y de la EM-PP.

Cladribina, (2-clorodeoxyadenosina), es un análogo sintético de la deoxyadenosina, pero a diferencia de ésta no es degradado por el enzima adenosindeaminasa (ADA). En el interior celular se fosforila a Cladribina trifosfato y se incorpora al extremo 3' de la cadena del ADN en formación, inhibiendo la elongación de la misma y conduciendo a la apoptosis celular. Es tóxica tanto para linfocitos en reposo como en proliferación (115).

- Fármacos con efecto sobre los LT: El Daclizumab (Zimbryta<sup>TM</sup>)

Daclizumab, actualmente en desuso, es un anticuerpo monoclonal que fue aprobado para su comercialización en Julio de 2016. Se une a la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL2 (el CD25) bloqueando su formación y por tanto inhibiendo selectivamente la activación de los LT. También activa las células inmunorreguladoras NK<sup>bright</sup>, permitiéndoles entrar en la zona intratecal para poder así destruir los LT autólogos activados (116)(117). En marzo de 2018 fue retirado del mercado ante la presencia de varios casos de encefalitis y meningoencefalitis grave.

- Fármacos con efecto citoprotector: Dimetil fumarato (Tecfidera®)

Dimetil fumarato (BG-12) es un fármaco oral recientemente comercializado que actúa sobre el factor nuclear Nrf2 responsable de mediar en la respuesta celular al estrés oxidativo, protegiendo las células del SNC. También inhibe el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) relacionado con la expresión de genes pro-inflamatorios (118).

### **2.6.1 Anticuerpos frente a tratamientos.**

Se ha visto que algunos pacientes tratados con natalizumab o con IFN- $\beta$  producen anticuerpos frente a dichos fármacos por lo que se reduce su eficacia

terapéutica y aumentan los efectos secundarios.

Los anticuerpos frente a natalizumab suelen desarrollarse hasta en un 12% de los pacientes tratados con este fármaco en algún momento durante el tratamiento, aunque la incidencia de anticuerpos positivos de forma persistente suele ser en torno al 6% de los pacientes(119)(120). Son anticuerpos de aparición temprana, encontrándose a partir del primer mes en el 72% de los pacientes que los desarrollan. Generalmente no suelen aparecer con posterioridad al cuarto mes de tratamiento (121).

Los anticuerpos neutralizantes del IFN- $\beta$  (NABs) suelen aparecer en el 30% (122)de los pacientes tratados con este fármaco, siendo mayor o menor este porcentaje según el tipo de IFN- $\beta$ , la dosis empleada, duración etc.

Tanto los pacientes con anticuerpos positivos frente a natalizumab como los que desarrollan anticuerpos frente a IFN- $\beta$ , presentan concentraciones séricas inferiores del fármaco y peor respuesta al tratamiento, observándose mayor tasa de brotes y de actividad de la enfermedad vista por RM. Asimismo, se observa una mayor progresión de la discapacidad en pacientes positivos para anti-natalizumab y en algunos de los que presentan NABs, en relación con los pacientes que no presentan dichos anticuerpos (119)(123)(124).

No se ha hallado relación entre el desarrollo de anticuerpos frente a natalizumab y la previa aparición de anticuerpos frente a IFN- $\beta$ (125).

## **2.7 Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad**

El diagnóstico de EM se basa en la identificación de lesiones en la sustancia blanca a las que se atribuyan los signos y síntomas que presenta el paciente, así como la diseminación de las lesiones en el espacio y tiempo, según los criterios de McDonald en su última revisión del 2010 (83). La prueba más sensible para detectar las lesiones es la

imagen por resonancia magnética (MRI).

También existen otras pruebas que ayudan al diagnóstico, como son los potenciales evocados, basados en el retraso de la respuesta en estudios electrofisiológicos visuales, somatosensoriales, auditivos y motores, característicos de la desmielinización.

Por otra parte, en torno al 90% de los pacientes con EM presentan un incremento de las concentraciones de inmunoglobulinas en suero y un patrón de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo diferente al del suero, con bandas en LCR que no aparecen en suero o mayor número en LCR que suero, que apoyan la evidencia de síntesis intratecal de inmunoglobulinas (126). Aun así no es una prueba diagnóstica en sí misma puesto que sólo alrededor del 60 % de los casos de síndrome aislado clínicamente (CIS) presentan dichas bandas (127).

Asimismo, en el LCR se incrementa el nivel de IgG, de tal forma que si se calcula el índice de IgG como  $(\text{IgG en LCR} / \text{albúmina en LCR}) / (\text{IgG suero} / \text{albúmina en suero})$ , suele superar el 0,66, considerando valores por debajo de éste como normales (82).

Para la valoración del paciente, tanto en el diagnóstico como en su posterior seguimiento, se suele emplear una de las escalas de discapacidad más fiables, el EDSS (Expanded Disability Status Scale). Esta escala propuesta por Kurtzke en 1983 se basa en cuantificar la afectación de ocho sistemas funcionales (visual, afectación del tronco cerebral, motor, sensitivo, cerebelo- vestibular, vesico-esfinteriano, sexual y mental) siendo éstos valorados individualmente en una escala de 0 a 5-6 y otorgando por tanto una puntuación final de EDSS entre 0-10, siendo 0 un examen neurológico normal y 10 la muerte debida a EM(128) (129).

Otra de las escalas utilizadas cuando se quiere realizar un estudio de progresión

de la enfermedad entre miembros de una misma familia con EM, o bien en estudios de asociación genética entre distintos individuos, es el MSSS (Multiple Sclerosis Severity Score). Esta escala combina la valoración de la discapacidad mediante el EDSS con el tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad, otorgando así una puntuación en función de ambos parámetros, y por tanto proporcionando un ajuste para los estudios transversales (130).



## **JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**



## **JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.**

El EBV está considerado como uno de los factores ambientales relacionados con la EM. Los niveles de anticuerpos IgG frente al virus están incrementados en estos pacientes frente al resto de la población, por lo que existe la posibilidad de que se deba a una reactivación del virus. De este modo, la falta de respuesta al tratamiento o la mala progresión de la enfermedad podrían estar asociadas a una reactivación del virus y por tanto a niveles más elevados de los anticuerpos citados en suero.

Además del componente ambiental, la EM tiene un componente genético reconocido, como se sabe desde hace años por los estudios sobre el HLA y recientemente por los estudios de asociación genómica GWAS, por lo que es de interés estudiar si el factor genético podría estar implicado en la respuesta al EBV y por tanto en la susceptibilidad a la enfermedad.



## **OBJETIVOS**



## **OBJETIVOS.**

Los objetivos del estudio son:

1. Analizar la posible asociación de los niveles de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA del EBV previos a cualquier tratamiento, con factores como la edad, sexo, duración de la enfermedad en años y MSSS de inicio.

2. Analizar la posible asociación del EBV en la evolución de la EMRR, valorando la variación en los niveles de anticuerpos IgG frente a los antígenos EBNA-1 y VCA del EBV en relación con las variables clínicas de brotes, progresión de la enfermedad y respuesta clínica al tratamiento para los fármacos natalizumab, IFN- $\beta$  y AG.

3. Estudiar la posible relación de los niveles de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA del EBV previos a cualquier tratamiento, con las variantes alélicas del HLA-IA, HLA-IB, HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1.

4. Estudiar la posible relación de los niveles de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA del EBV previos a cualquier tratamiento, con 42 de los SNPs asociados a EM en los últimos GWAS.

5. Determinar los niveles de anticuerpos IgG frente a los antígenos EBNA-1 y VCA del EBV en individuos control y estudiar la relación con los factores: sexo, edad y las variantes alélicas del HLA DRB1\*15:01 asociado a EM.





## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1. Diseño del estudio.**

Se realizaron dos tipos diferentes de estudio dentro de este trabajo:

- Estudio longitudinal retrospectivo de seguimiento a dos años de una cohorte de pacientes con EM-RR, en el que se comparó la relación entre los datos de las historias clínicas de brotes, progresión de la enfermedad y respuesta clínica al tratamiento, frente a la variación en la medida de anticuerpos IgG contra EBNA-1 y VCA del EBV.

- Estudio transversal de la posible relación entre los niveles previos al inicio del tratamiento de los pacientes y diferentes variables de interés, así como la comparación entre individuos control y pacientes.

### **2. Población de estudio.**

Se incluyeron 325 pacientes (216 mujeres y 109 hombres) con edades comprendidas entre los  $36,3 \pm 8,2$  años, del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC) diagnosticados de EM-RR según los criterios de Poser et al. (131) o de McDonald et al. (83), que tuviesen un seguimiento de la enfermedad de dos o más años, durante los cuáles estuviesen, de forma continuada, bajo alguno de los siguientes tratamientos: natalizumab, IFN- $\beta$  o AG, y se dispusiese de muestra de suero previa al comienzo del tratamiento y tras 24 meses desde el inicio del mismo, así como muestras intermedias cada 6 meses para valorar la evolución.

Los individuos considerados como grupo control fueron 295 donantes de sangre del HCSC (180 hombres y 115 mujeres) de  $38,8 \pm 11,3$  años de edad, que no presentaban la enfermedad ni antecedentes familiares de la misma.

Tanto los pacientes como los individuos control fueron incorporados al estudio tras haber firmado el correspondiente consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del HCSC.

### **3. Variables de estudio**

Se recogieron las variables sexo, edad, fecha de inicio de la enfermedad, tratamiento, puntuación de la Expanded Disability Status Scale (EDSS) previa al tratamiento y a los dos años desde el comienzo del mismo, puntuación de la Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) y número de brotes durante esos dos años de seguimiento.

Se definió brote como cualquier síntoma neurológico focal, nuevo o empeoramiento de síntomas antiguos, de más de 24 horas de duración, separado de cualquier otro síntoma neurológico focal un mínimo de 30 días, y sin la coexistencia de fiebre, infecciones o cualquier otro desencadenante sistémico.

Se determinaron las variables progresión y respuesta al tratamiento, definiéndose como:

- Progresión de la enfermedad:
  1. si el EDSS previo al tratamiento era de 0 y tras los dos años de seguimiento experimentaba un aumento  $\geq 1,5$
  2. si el EDSS previo al tratamiento estaba entre 1-5 y tras los dos años de seguimiento experimentaba un aumento  $\geq 1$
  3. si el EDSS previo al tratamiento era  $\geq 5,5$  y tras los dos años de seguimiento experimentaba un aumento  $\geq 0,5$

- Respuesta al tratamiento:
  1. Respondedor: máximo un brote durante los dos años de seguimiento y no progresión de la enfermedad.
  2. No Respondedor: presencia de dos o más brotes en los dos años de seguimiento y/o progresión de la enfermedad.

Estos criterios de Respuesta, no respuesta y progresión estrictos fueron elegidos por ser los utilizados en la mayoría de los estudios, y para optimizar la detección de las asociaciones más robustas (132) (133).

#### **4. Descripción de los estudios realizados**

##### **Estudio longitudinal**

Los pacientes del estudio fueron clasificados en tres grupos en función del tratamiento tomado durante los dos años de seguimiento: natalizumab, IFN- $\beta$  o AG. Con estos pacientes se realizaron dos estudios:

-Se seleccionó una muestra de suero previa al inicio del tratamiento y posteriormente muestras cada 6 meses desde el inicio hasta completar los dos años de seguimiento. Se realizó una medida de los valores de anticuerpos IgG frente a los antígenos EBNA-1 y VCA del EBV en las muestras seleccionadas. Dichos valores se relacionaron posteriormente a través del estudio estadístico con la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (basadas en las variables EDSS y brotes, tal y como se considera en el punto 1.3) teniendo en cuenta las variaciones en los valores de anticuerpos durante el periodo de estudio a dos años.

- Dado que los pacientes tratados con IFN- $\beta$  o los tratados con natalizumab pueden desarrollar anticuerpos frente al fármaco, se determinaron los valores de dichos anticuerpos y se eliminaron del estudio los pacientes que tenían valores positivos para

anticuerpos neutralizantes frente a natalizumab o frente a IFN- $\beta$ . Con este subgrupo de pacientes se realizó el mismo estudio de variación de los valores de anticuerpos frente a EBNA-1 y VCA frente a las variables brotes, progresión y respuesta al tratamiento, para obviar o prevenir la posible interferencia que pudiesen provocar la presencia de dichos anticuerpos en las variables estudiadas.

### **Estudio transversal**

Los valores de los anticuerpos IgG en suero frente a EBNA-1 y VCA de la muestra previa al tratamiento considerada como muestra basal, fueron relacionados con las variables de edad del paciente en el momento de dicha extracción, sexo, duración de la enfermedad en años hasta la extracción de la muestra considerada basal y MSSS en el momento de la extracción.

Asimismo, se analizaron los alelos HLA-IA, HLA-IB, HLA-II (DQA, DQB y DR) y 42 SNPs relacionados con la EM, para cada uno de los pacientes y se estudió su posible asociación con los valores más elevados o más bajos de los anticuerpos frente a EBNA-1 y VCA.

También se realizó un estudio transversal de los individuos control, determinando los valores de IgG frente a EBNA-1 y VCA en una muestra de suero, y analizando la relación de los mismos con las variables sexo, edad del individuo, y los alelos presentes del subtipo DRB1\*15:01 dado que es el más relacionado con la susceptibilidad genética a la EM.

## **5. Obtención de muestras**

Se extrajo sangre de los pacientes por punción venosa, previa al inicio del tratamiento, y cada 6 meses una vez iniciado el mismo, durante los dos años del estudio como parte de las visitas de seguimiento.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos CPT (Becton Dickinson, NJ, USA) de 8 mL, y en tubo seco de 5 mL sin anticoagulante para la posterior recogida del suero necesario para el análisis serológico.

Para la obtención de suero se centrifugó la muestra a 2100 rpm durante 15 minutos y se hicieron alícuotas de 200 µL que se congelaron a -80°C hasta el momento del análisis.

En el caso de los individuos control el procedimiento fue similar, extrayéndose en una sola ocasión al no ser un estudio de seguimiento de los mismos.

## **6. Extracción y cuantificación de ADN**

La muestra de sangre extraída se centrifugó durante 30 minutos a 2500 rpm para la separación de las células sanguíneas del plasma. Se extrajo el ADN de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de 200 µl de sangre, mediante la técnica de centrifugación en columna a través del QIAamp ADN Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Durante el proceso de extracción de ADN, por cada grupo de 15 muestras se introdujo 1 blanco (mezcla de reacción y PBS) con el fin de evaluar la existencia de una posible contaminación entre muestras. Todas estas muestras fueron alicuotadas y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

La cuantificación del ADN genómico extraído se realizó por espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EEUU) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y considerando que cada unidad de OD se corresponde con 50 ng/µL de ADN. Para estimar la pureza del ADN se obtuvo el ratio de la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm ( $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ),

encontrándose este valor comprendido entre 1,7 y 1,8. Posteriormente se realizaron alícuotas de trabajo de 10 ng/ $\mu$ L con agua destilada.

## 7. Genotipado de SNPs.

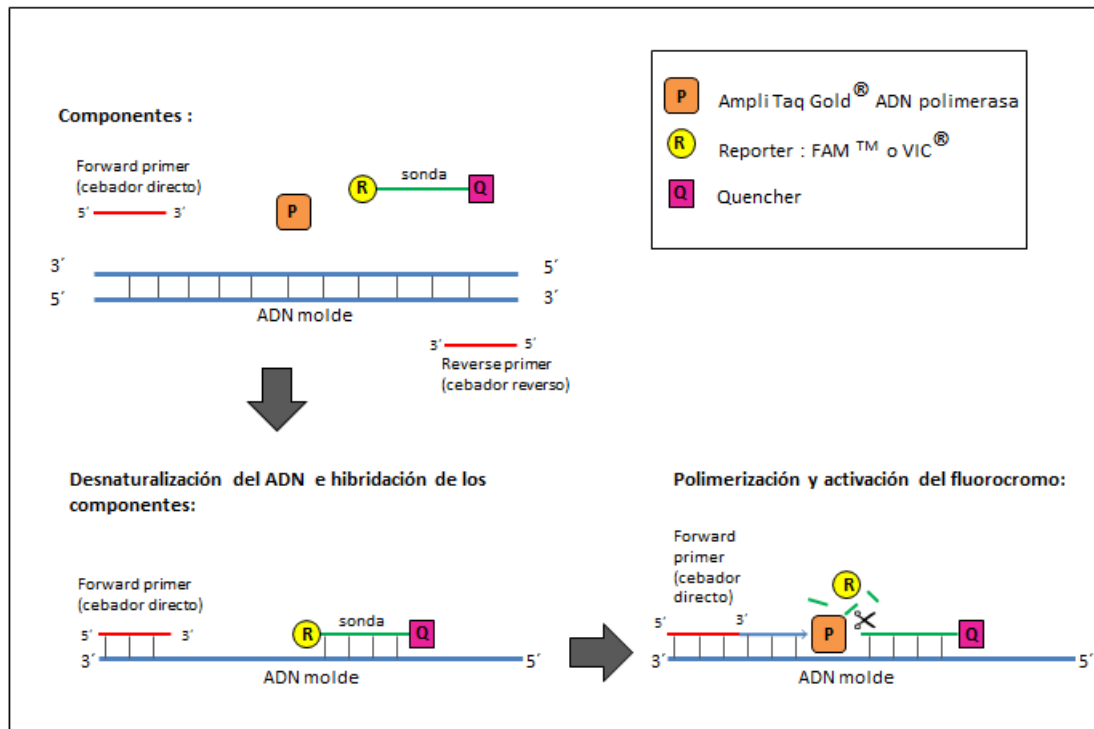
El genotipado de los SNPs fue realizado a través de PCR a tiempo real (rt-PCR) empleando sondas TaqMan® y mediante el equipo ABI PRISM 7900HT (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU*).

Las sondas TaqMan® son oligonucleótidos complementarios a la secuencia del DNA que contiene el polimorfismo que queremos analizar. Esta sonda está marcada en su extremo 5' con un fluorocromo denominado *reporter* que puede ser FAM (6-carboxifluoresceína) o VIC (4, 7, 2', 4', 5', 7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína) específicos para los distintos alelos del SNP que se va a genotipar. En el extremo 3' presentan una molécula secuestradora de fluorescencia llamada *quencher*.

Cuando la sonda no está unida al ADN molde no emite fluorescencia puesto que la molécula *quencher* capta la fluorescencia del *reporter* y no se detecta.

Durante la amplificación mediante la PCR, la polimerasa polimeriza la cadena de ADN a partir del primer y al alcanzar la región en la que está unida la sonda rompe y separa la molécula *reporter* gracias a la actividad 5'-3' exonucleasa que posee, por lo que al separarse del *quencher* el fluorocromo emite fluorescencia que puede ser detectada por el equipo al ser iluminada con un láser. En función del fluorocromo detectado indica el alelo presente en la región de estudio.





**Figura 6.** Esquema de rt-PCR.

Se empleó una mezcla de reacción compuesta por el enzima ADN polimerasa (Taq Gold), tampón, nucleótidos,  $MgCl_2$  y amperasa (para garantizar la pureza de la amplificación degradando cualquier amplicón inespecífico), además de los iniciadores y sondas específicos de cada SNP de estudio.

Las condiciones de la PCR utilizada fueron: 2 min a 50°C (para la activación de la enzima amperasa), 10 min a 95°C (para la activación de la enzima polimerasa e inactivación de la amperasa) y 40 ciclos consistentes en 15 segundos a 95°C (para la desnaturalización) y 1 min a 60°C (para la hibridación y elongación).

### 7.1 SNPs de estudio.

Se seleccionaron 42 SNPs dentro de los polimorfismos asociados a EM encontrados en los recientes estudios GWAS del grupo internacional de EM (134).

Estos SNPs abarcan diferentes vías patogénicas de la EM, siendo 3 de ellos desconocidos hasta el momento, pero se han incluido para valorar también su posible asociación con los títulos de anticuerpos analizados en este estudio en relación con la enfermedad.

Los SNPs seleccionados fueron:

- 1) rs10201872 (C/T). Gen SP140. Alelo de frecuencia menor (MAF): T=0.0929/465. Codifica la proteína SP140, proteína con un motivo estructural dominio en dedo de zinc, que forma parte del cuerpo nuclear, y que al igual que otras proteínas con dicha estructura suelen estar implicadas en control del desarrollo, crecimiento y diferenciación celular. Participa en funciones de regulación del sistema inmune y está relacionado con la infección viral (135).
- 2) rs10466829 (A/G). Gen CLECL1. MAF: A=0.498/1084. Codifica para la proteína *C-type lectin-like domain family 1*. Actúa como molécula co-estimuladora de las células T, favoreciendo respuestas tipo Th2 y aumentando la producción de IL-4 (136).
- 3) rs11129295 (C/T). Gen EOMES (*eomesodermin homolog*). MAF: C=0.4653/2330. Interviene en la diferenciación de los linfocitos T CD8+ durante la respuesta inmune, regulando la transcripción de genes efectores líticos. Su expresión se ve aumentada en presencia de TGFB1 e IL-4 (137) (138).
- 4) rs11154801 (A/C). Gen MYB. MAF: A=0.2863/1434. Protooncogen de la familia MYB (“mieloblastosis”) de factores de transcripción. Regula funciones de diferenciación y proliferación de los progenitores hematopoyéticos, con especial importancia en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta Th2 (139)(140).

- 5) rs11810217 (C/T). Gen EVI5 (*Ecotropic viral integration site 5*). MAF: T=0.1340/671. Oncogén que actúa regulando el ciclo celular. Su depleción ocasiona alteraciones y detención de la mitosis (141).
- 6) rs12212193 (A/G). Gen BACH2. MAF: G=0.300/653. Factor de transcripción de la familia bZIP (*basic leucine zipper*) En modelos animales se han observado funciones de este gen en la maduración de los LB y producción de inmunoglobulinas (142),(143), y en la formación de LTreg y disminución de la diferenciación a células T efectoras Th1 Th2 y Th17 (144).
- 7) rs12368653 (A/G). Gen CYP27B1. MAF: A=0.317/690. Enzima de la familia del citocromo P450. Se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial. Metaboliza el último paso de la síntesis de Vitamina D al hidroxilar la 25-dihidroxi-vitamina D3 a la forma activa 1-alfa, 25-dihidroxi-vitamina D3 (145).
- 8) rs12466022 (A/C). (Gen no conocido). MAF: A=0.304/663.
- 9) rs1250550 (G/T). Gen ZMIZ1. MAF: T=0.295/643. Factor de transcripción. Regula diversos procesos celulares, aunque se conoce poco sobre esta proteína (146).
- 10) rs13192841 (A/G). Gen no conocido. MAF: A=0.2019/1011.
- 11) rs13333054 (C/T). Gen IRF8. MAF: T=0.2907/1456. Factor de transcripción de la familia de factores reguladores de los IFN de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) y genes del HLA-I inducibles por IFN. Presente mayoritariamente en células del sistema inmunitario, actúa regulando su diferenciación y la respuesta inmunitaria, a través de la unión con el heterodímero BATF-JUNB (147) (148).

- 12) rs1335532 (C/T). Gen CD58 o LFA-3. MAF: C= 0.4333/2170. Expresado en las APC. Es el ligando del receptor CD2 de las células T, y actúa favoreciendo la unión entre ambos tipos celulares (149).
- 13) rs140522 (A/G). Gen SCO2. MAF: A= 0.3810/1908. Proteína de ensamblaje para la síntesis de la citocromo C oxidasa. Permite la unión de Cobre a dicha enzima, para su correcto funcionamiento en producción de energía en la cadena respiratoria mitocondrial. Mutaciones de esta proteína se han asociado con una forma fatal de cardio-encefalo-miopatía infantil(150).
- 14) rs1520333 (C/T). Gen IL7. MAF: C= 0.4605/2306. Interleuquina que actúa sobre los progenitores linfoides inmaduros, favoreciendo su desarrollo, especialmente los LB (151).
- 15) rs17066096 (A/G). Gen IL22RA2. MAF: G=0.1657/830. Codifica para una proteína soluble que se une al receptor de IL-22 actuando como antagonista de esta citoquina y evitando sus acciones inflamatorias (152)(153).
- 16) rs17174870 (C/T). Gen MERTK. MAF: T=0.2400/1202. Protein-quinasa. Se ha relacionado con diversas funciones celulares, entre las que destacan diferenciación celular, migración celular y fagocitosis de células apoptóticas. A nivel inmunológico tiene acciones antiinflamatorias, regulando a la baja vías de señalización de citoquinas inflamatorias a través de la inhibición de los receptores Toll-like (154).
- 17) rs1738074 (A/G). Gen TAGAP. MAF: A=0.441/961. GTPasa. Participa en procesos de activación de las células T (155).

- 18) rs2019960 (C/T). Gen PVT1. MAF: C=0.2442/1223. Oncogén relacionado con el factor de transcripción c-myc. Se encuentra alterado en diferentes tumores, principalmente neuroblastoma y procesos linfoproliferativos (156) (157).
- 19) rs2119704 (A/C). Gen GALC. MAF: A=0.1332/667. Galactocerebrosidasa. Metaboliza la galactosilceramida, uno de los principales lípidos de la mielina (158).
- 20) rs2243123 (C/T). Gen IL12A. MAF: C=0.1633/818. Subunidad alfa de la IL-12. Necesaria para la inducción de IFN-gamma independiente de linfocitos T, y para la diferenciación de las células Th1 y Th2 (159) (160).
- 21) rs2248359 (C/T). Gen CYP24A1. MAF: T=0.4493/2250. Codifica la proteína 1-25 dihidroxi-vitamina D3 24 hidroxilasa, proteína de la familia del citocromo P450, que participa en el metabolismo del calcio, iniciando la degradación de la vitamina D activa (161).
- 22) rs2283792 (G/T). Gen MAPK1. MAF: T=0.4627/2317. Pertenece a la familia de las proteínas-quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Interviene como factor de transcripción en múltiples procesos celulares, como división celular, endocitosis, quimiotaxis, apoptosis, etc. A nivel inmunológico y, en modelos animales, se ha observado una disminución de los linfocitos CD4 y CD8 maduros (162).
- 23) rs2293370 (C/T). Gen TIMMDC1 (translocasa del dominio 1 de la membrana mitocondrial interna). MAF: T=0.2071/1037. Codifica para una proteína que participa en el ensamblaje del complejo I de la membrana mitocondrial interna necesario para la fosforilación oxidativa. La reducción de esta proteína se relaciona con la disminución de la proliferación celular y migración. (163)(164).

- 24) rs2300603 (C/T). Gen BATF. MAF: C=0.2113/1058. Pertenece a la superfamilia de activadores de la proteína 1 (AP-1) de los factores de transcripción bZIP. Actúa en la elaboración y mantenimiento de la respuesta inmune, regulando la activación de varios linajes celulares, entre los que se encuentran la diferenciación hacia células Th17 (165), células T foliculares (166), células dendríticas (167), células CD8 (168) y LB (169).
- 25) rs2303759 (G/T). Gen DKK1. MAF: G=0.3183/1594. Codifica para una proteína que inhibe la vía de señalización Wnt relacionada con la proliferación celular y desarrollo del sistema inmune (170).
- 26) rs2546890 (A/G). Gen IL12B. MAF: A=0.4403/2205. Subunidad beta de la interleuquina inflamatoria IL12 (171).
- 27) rs3118470 (C/T). Gen IL2RA. MAF: C=0.3185/1595. Subunidad alfa del receptor de IL2, también denominada CD25. La unión de la IL-2 a su receptor induce la proliferación de diferentes poblaciones linfocitarias (172)
- 28) rs4410871 (C/T). Gen PVT1. MAF: T=0.2839/1422. Oncogén implicado en la regulación de la división y el ciclo celular (173).
- 29) rs4613763 (C/T). Gen PTGER4. MAF: C=0.0903/452. Receptor 4 de la prostaglandina E, con acciones anti-inflamatorias (174)
- 30) rs4648356 (A/C). Gen MMEL1. MAF: A=0.4681/2344. Metallo-endopeptidasa de membrana tipo 1. Se conoce poco sobre las funciones de este gen. Se supone que, al igual que otras metaloproteasas, está implicada en la degradación de diversos péptidos de pequeño tamaño (175)(176).

- 31) rs4902647 (C/T). Gen ZFP36L1. MAF: T=0.4876/2442. Codifica la proteína *zinc finger protein 36 C3H1 type-like 1* o también conocida como factor de respuesta al butirato. Es un factor de transcripción celular del grupo de los genes de respuesta rápida. Interviene en múltiples acciones celulares, especialmente en la respuesta a factores de crecimiento, y, en menor medida, la regulación de células T y B (177) (178).
- 32) rs669607 (G/T). Gen no conocido. MAF: G=0.3578/1792
- 33) rs7200786 (A/G). Gen CLEC16A. MAF: A= 0.4629/2318. Proteína con dominio de lectina tipo C. Presente en LB, Natural Killers y células dendríticas. Asociada con el riesgo de desarrollar diferentes enfermedades autoinmunes (179).
- 34) rs7238078 (G/T). Gen MALT1. MAF: G=0.2436/1220. Paracaspasa esencial en la activación de células T, y, en menor medida, de los LB, a través del factor de transcripción Nuclear Factor Kappa Beta (NF-kappaB)(180).
- 35) rs7522462 (A/G). Gen KIF21B. MAF: A=0.1314/658. Codifica una proteína de tipo quinesina, cuya acción principal es el transporte axonal. Dada esta función, se especula que podría tener un papel neurodegenerativo en la EM (181).
- 36) rs7595037 (C/T). Gen PLEK. MAF: C=0.3285/1645. Codifica la proteína Pleckstrin. Es uno de los principales sustratos de la protein-quinasa C de las plaquetas. No se conoce con exactitud su función, aunque se postula que podría actuar regulando diferentes funciones celulares, como por ejemplo agregación plaquetaria y coagulación, organización del citoesqueleto, diferenciación de células hematopoyéticas, señalización y tráfico celular, entre otras (182)(183)(184).

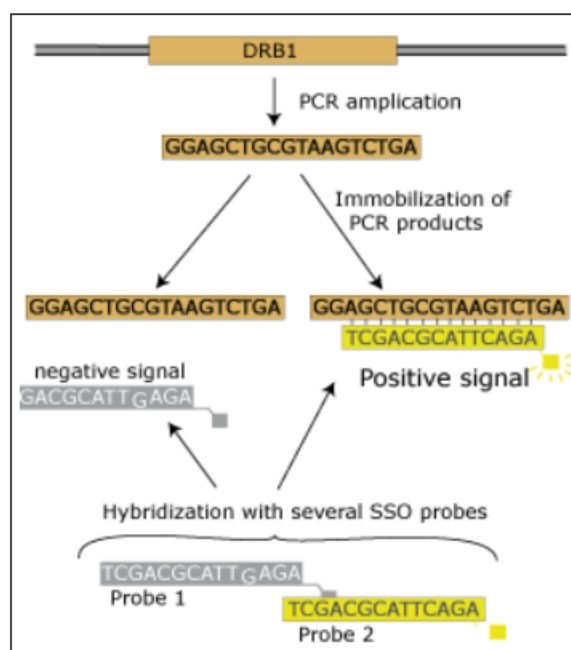
- 37) rs7923837 (A/G). Gen HHEX. MAF: A=0.4289/2148. Forma parte de los factores de transcripción de la familia homeobox. En modelos animales se ha encontrado la participación de este gen en la formación de LB y producción de anticuerpos(185)(186).
- 38) rs802734 (C/T). Gen THEMIS. MAF: C=0.1963/983. Controla la correcta maduración y selección de los linfocitos T (187).
- 39) rs8112449 (A/G). Gen TYK2. MAF: A=0.3758/1882. Tirosin-quinasa 2. Interviene en las vías de señalización de los IFN-I e IFN-II y varias citoquinas entre las que se encuentran la IL-12, IL-6, IL-10 e IL-23 (188)(189).
- 40) rs874628 (C/T). Gen MPV17L2. MAF: C=0.1747/875. Proteína-2 de membrana de mitocondria. Se desconoce su función exacta (190).
- 41) rs9282641 (A/G). Gen CD86. MAF: A=0.0545/273. Molécula co-estimuladora de los linfocitos T (191)(192).
- 42) rs949143 (A/G). Gen PITPNM2. MAF: A=0.4914/2461. Proteína de transferencia del Fosfatidilinositol asociada a la membrana relacionada con el tráfico vesicular intracelular y la exocitosis (193).

## **8. Genotipado de los HLA**

El genotipado de los HLA-I y HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 se realizó mediante la técnica PCR-SSOP (Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid Probe). Mediante esta técnica se amplifica el segundo exón de cada uno de estos genes porque es donde se encuentran los polimorfismos que distinguen los alelos. Una vez amplificado el ADN se inmoviliza sobre una membrana de nitrocelulosa



mediante la técnica de Dot-Blot y se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicas de alelo unidas a un fluorocromo para detectar la quimioluminiscencia.



**Figura 7.** Esquema de PCR-SSOP (extraído de

[http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/donor/HLA\\_typing/SSO.php](http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/donor/HLA_typing/SSO.php))(194)

### 8.1 Genotipado del alelo DRB1\*15:01

El alelo DRB1\*15:01 es el principal alelo relacionado con la susceptibilidad a la EM y su presencia fue determinada mediante el genotipado del SNP rs3135388. Este SNP presenta una correlación mayor del 0,94 con el alelo *DRB1\*15:01*, y para tiparlo se empleó un ensayo TaqMan ya validado con anterioridad (195). Esta técnica fue realizada en aquellos individuos en los que el tipaje PCR-SSOP indicaba existencia del alelo *HLA-DRB1\*02*.

## 9. Determinación de los Anticuerpos frente a EBNA-1 y VCA.

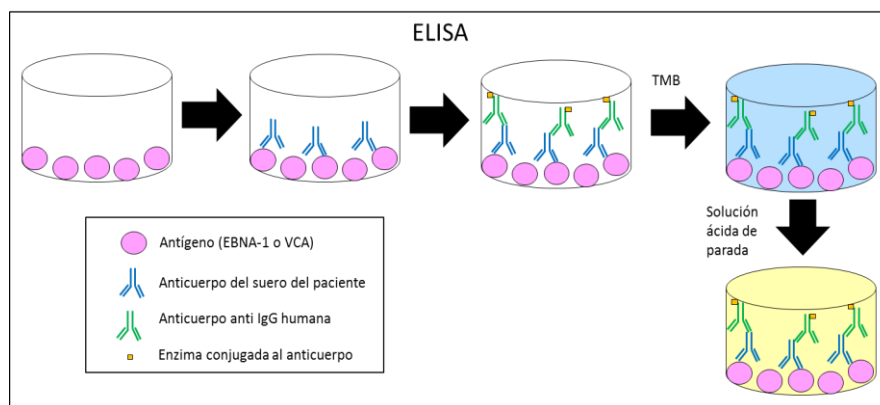
El análisis de los niveles de anticuerpos frente al EBV fue realizado mediante los kits de determinación de IgG de *Trinity Biotech Captia™ Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen- 1* (EBNA-1) y *Trinity Biotech Captia™ Epstein-Barr Viral Capsid Antigen* (VCA).

Dichos Kits se basan en un ensayo inmunoenzimático ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) indirecto. El antígeno EBNA o VCA respectivamente, está adsorbido a una placa de poliestireno. Tras realizar una dilución previa 1:42 de las muestras, calibradores y controles con un diluyente proporcionado por el propio kit, se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido ese tiempo se elimina mediante 5 lavados el exceso de anticuerpos de la muestra no unidos de forma específica al antígeno fijado.

Se añaden a cada pocillo 100  $\mu$ L de un anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) anti inmunoglobulina humana del inmunocomplejo de interés formado, y se incuba otros 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de otros 5 lavados para eliminar el exceso de conjugado no unido. Tras esto, se añaden 100  $\mu$ L por pocillo de sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB) y se incuba durante 15 minutos en condiciones de oscuridad. Transcurrido el tiempo se detiene la reacción enzimática con 100  $\mu$ L por pocillo de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 1N.

La presencia de una coloración amarilla una vez detenida la reacción, indica la existencia de anticuerpos en el suero del paciente frente a los antígenos de interés. Dicha intensidad será proporcional a la concentración de anticuerpos existentes en la muestra y se determina mediante la medida de la absorbancia a dos longitudes de onda ( $\lambda$ ) 450 y 620 nm mediante un espectrofotómetro. La  $\lambda$  de 620 nm se emplea como filtro de referencia para corregir las variaciones ópticas en la microplaca de poliestireno.



**Figura 8.** Esquema-resumen de los pasos del ELISA indirecto.

Para asegurar la validez de cada ensayo el control de calidad fue realizado a través de un control negativo, un control positivo de alta concentración y otro positivo de concentración intermedia en cada microplaca.

La determinación de los niveles de anticuerpos se realizó mediante la medida por triplicado de la densidad óptica (OD) del calibrador de cada kit y multiplicando la media de dichas OD por un factor de corrección indicado en el vial, para reducir las posibles fluctuaciones debido a diferencias en la temperatura etc de cada ensayo, obteniendo así un punto de corte del valor del calibrador.

Con ello se obtuvo un Ratio del estado inmune (ISR) dividiendo el valor de la OD para cada muestra entre el punto de corte calculado.

Los distintos pasos de la reacción del ELISA fueron realizados mediante el sistema automatizado DS2® de Alere.

## 10. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado a través del software IBM® SPSS statistics® para windows, versión 15.0.

Los p-valores inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos para los análisis correspondientes.

Las variables cuantitativas con distribución normal fueron consideradas a través de su media y desviación típica, mientras que para las que no tenían distribución normal se tuvo en cuenta la mediana y el rango intercuartílico.

Las variables categóricas fueron representadas con su distribución de frecuencias y porcentajes.

Para los estudios de variación de los valores de anticuerpos en función de la progresión o la respuesta al tratamiento del paciente se empleó el test de la mediana, considerando como variable de agrupación la categórica correspondiente.

Las correlaciones de las variables cuantitativas no paramétricas fueron realizadas a través del Coeficiente de correlación Rho ( $\rho$ ) de Spearman.

Las asociaciones entre variables categóricas se estudiaron a través de la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para aquéllos análisis que pretendían comparar dos variables cuantitativas independientes no paramétricas y la prueba T de Student para las que eran paramétricas.

En el caso de que alguno de los pacientes tuviese un valor perdido para alguna de las variables de estudio esos individuos se eliminaron del análisis correspondiente.

## **RESULTADOS**



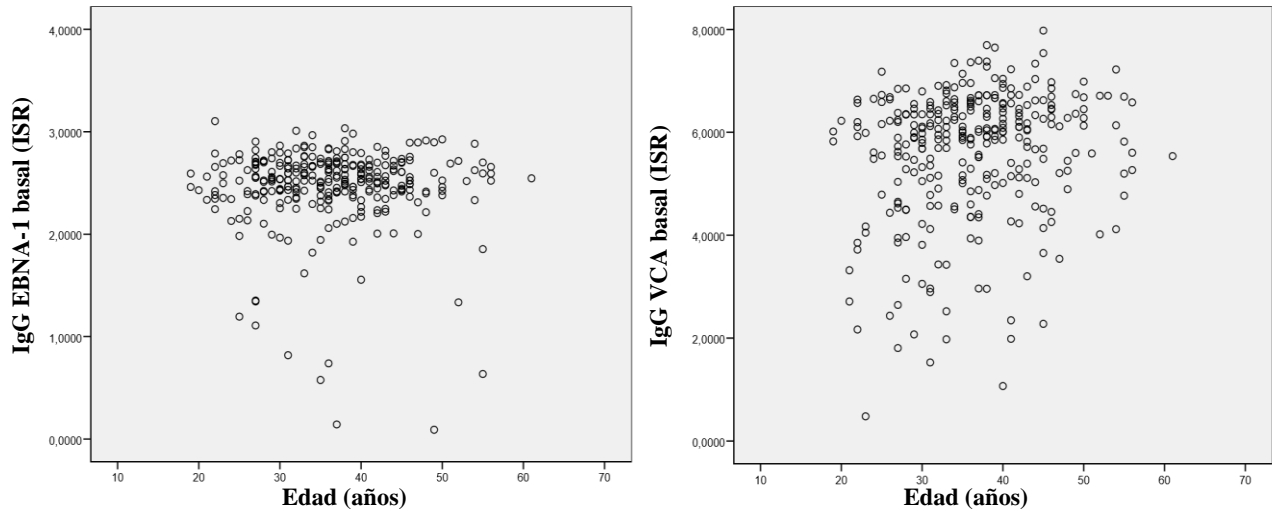
## **RESULTADOS**

Se incluyeron un total de 325 pacientes del HCSC de Madrid diagnosticados de EM-RR, de los cuáles 112 estaban tratados con natalizumab (34,5%), 82 con AG (25,2%) y 131 con IFN- $\beta$  (40,3%).

### **1. Análisis de los niveles basales de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA en relación con los factores edad, duración de la enfermedad en años, MSSS de inicio y sexo.**

Se valoraron determinadas características demográficas y clínicas considerando los valores basales de anticuerpos frente a los dos antígenos estudiados del EBV previos al inicio de cualquier tratamiento. Este análisis se basó en la correlación mediante el coeficiente Rho ( $\rho$ ) de Spearman entre las dos variables cuantitativas contrastadas.

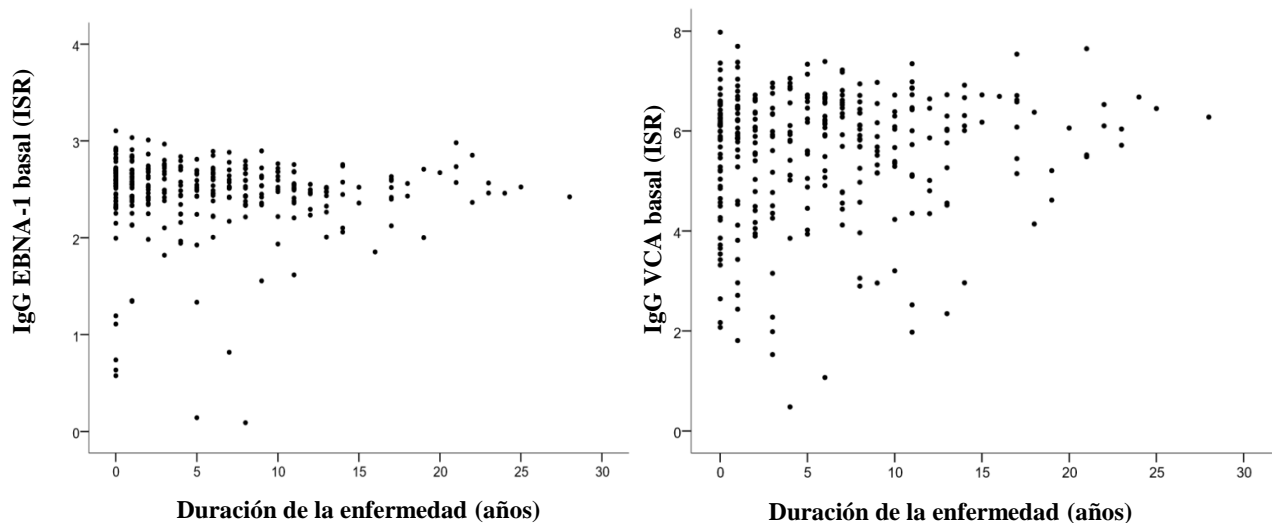
La media de edad previa al inicio del tratamiento para los pacientes estudiados fue de  $36,2 \pm 8,2$  años. No se observó una correlación lineal entre los valores de las IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA basales y la edad del paciente en dicho momento (Figura 9), obteniéndose un coeficiente Rho de Spearman de 0,021 y 0,169 respectivamente.



**Figura 9.** Valores basales de IgG frente a los antígenos EBNA-1 y VCA del EBV en relación con la edad.

La duración de la enfermedad hasta el comienzo del tratamiento en esta cohorte de pacientes era de 5 (1-9) años.

Al analizar la correlación entre esta variable y los valores basales de anticuerpos frente a ambos antígenos del EBV no se observó una correlación lineal ( $\rho = -0,126$  para EBNA-1 y  $\rho = 0,073$  para VCA), tal y como se refleja en la figura 10.



**Figura 10.** Valores de los anticuerpos IgG frente a los antígenos EBNA-1 y VCA previos al inicio del tratamiento, en relación con la duración de la enfermedad.



La variable duración de la enfermedad fue considerada a su vez para el cálculo del MSSS al inicio del tratamiento, cuya mediana fue de 3,0 (1,4- 4,8). Dicho MSSS fue calculado a partir de la tabla representada en la figura 11, que otorga un valor de MSSS más alto y por tanto mayor progresión al paciente que con un determinado EDSS lleva menos años de duración de la enfermedad.

	0	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	EDSS
1	0.67	2.44	4.30	5.87	7.08	7.93	8.64	9.09	9.35	9.50	9.63	9.74	9.84	9.90	9.94	9.97	9.98	9.98	9.99	
2	0.53	2.01	3.69	5.24	6.46	7.27	7.98	8.58	8.95	9.18	9.38	9.59	9.79	9.88	9.93	9.97	9.99	9.99	9.99	
3	0.45	1.77	3.34	4.82	6.00	6.81	7.54	8.14	8.55	8.83	9.07	9.35	9.63	9.77	9.86	9.92	9.97	9.98	9.99	
4	0.35	1.45	2.87	4.27	5.41	6.24	6.98	7.65	8.12	8.42	8.70	9.08	9.47	9.68	9.80	9.88	9.95	9.98	9.99	
5	0.30	1.28	2.60	3.90	4.95	5.79	6.58	7.26	7.75	8.08	8.38	8.83	9.32	9.60	9.76	9.86	9.95	9.98	9.99	
6	0.25	1.13	2.33	3.54	4.55	5.38	6.14	6.81	7.33	7.68	7.99	8.50	9.08	9.45	9.68	9.81	9.93	9.97	9.99	
7	0.24	1.04	2.10	3.17	4.13	4.96	5.75	6.46	6.98	7.32	7.65	8.24	8.91	9.33	9.59	9.76	9.90	9.95	9.99	
8	0.21	0.94	1.92	2.93	3.81	4.57	5.36	6.10	6.61	6.95	7.32	7.97	8.71	9.21	9.55	9.74	9.89	9.96	9.99	
9	0.21	0.88	1.76	2.65	3.45	4.17	4.93	5.64	6.14	6.50	6.90	7.65	8.53	9.09	9.47	9.70	9.87	9.95	9.99	
10	0.19	0.78	1.53	2.34	3.10	3.79	4.55	5.28	5.77	6.14	6.58	7.39	8.31	8.92	9.34	9.61	9.83	9.94	9.99	
11	0.17	0.71	1.40	2.13	2.82	3.46	4.21	4.94	5.42	5.82	6.30	7.18	8.15	8.79	9.24	9.52	9.78	9.92	9.98	
12	0.16	0.64	1.28	1.98	2.64	3.25	3.94	4.63	5.13	5.54	6.03	6.92	7.93	8.63	9.13	9.43	9.71	9.86	9.97	
13	0.13	0.57	1.14	1.80	2.44	3.05	3.70	4.38	4.91	5.32	5.80	6.74	7.83	8.55	9.03	9.34	9.65	9.85	9.96	
14	0.11	0.49	1.03	1.70	2.33	2.91	3.55	4.26	4.82	5.23	5.70	6.66	7.59	8.34	8.86	9.20	9.57	9.82	9.95	
15	0.10	0.45	0.99	1.64	2.26	2.82	3.44	4.14	4.68	5.09	5.51	6.33	7.41	8.17	8.70	9.11	9.51	9.76	9.94	
16	0.09	0.38	0.85	1.42	1.99	2.56	3.17	3.86	4.41	4.81	5.18	6.00	7.14	7.97	8.54	9.04	9.49	9.75	9.94	
17	0.05	0.32	0.76	1.28	1.77	2.30	2.95	3.65	4.17	4.55	4.94	5.74	6.89	7.77	8.38	8.99	9.52	9.79	9.96	
18	0.04	0.26	0.66	1.12	1.57	2.09	2.70	3.37	3.89	4.27	4.62	5.43	6.62	7.54	8.23	8.94	9.51	9.78	9.96	
19	0.05	0.28	0.63	1.00	1.39	1.89	2.50	3.19	3.72	4.12	4.49	5.35	6.59	7.51	8.22	8.98	9.57	9.81	9.96	
20	0.05	0.26	0.59	0.94	1.29	1.71	2.29	2.99	3.51	3.93	4.30	5.15	6.43	7.45	8.23	8.98	9.58	9.80	9.95	
21	0.05	0.30	0.66	1.02	1.39	1.77	2.34	2.97	3.43	3.83	4.21	5.09	6.35	7.33	8.08	8.87	9.49	9.77	9.96	
22	0.04	0.23	0.54	0.90	1.28	1.66	2.20	2.82	3.29	3.69	4.09	5.04	6.35	7.35	8.10	8.84	9.42	9.73	9.95	
23	0.05	0.27	0.58	0.91	1.26	1.64	2.19	2.78	3.21	3.69	4.19	5.16	6.47	7.46	8.20	8.87	9.43	9.75	9.95	
24	0.05	0.24	0.52	0.86	1.25	1.63	2.15	2.71	3.09	3.52	4.01	5.03	6.36	7.38	8.15	8.81	9.39	9.74	9.96	
25	0.05	0.23	0.47	0.77	1.15	1.56	2.05	2.53	2.84	3.21	3.74	4.88	6.26	7.24	8.00	8.73	9.35	9.75	9.98	
26	0.05	0.20	0.45	0.78	1.17	1.58	2.08	2.63	2.99	3.40	3.95	5.02	6.39	7.44	8.21	8.89	9.48	9.80	9.96	
27	0.05	0.22	0.48	0.78	1.15	1.56	2.03	2.56	2.91	3.29	3.86	4.93	6.33	7.38	8.14	8.91	9.56	9.85	9.98	
28	0.04	0.17	0.40	0.74	1.16	1.52	1.88	2.39	2.76	3.04	3.46	4.54	5.99	7.07	7.90	8.75	9.45	9.80	9.98	
29	0.03	0.18	0.47	0.80	1.19	1.51	1.79	2.27	2.68	3.01	3.41	4.35	5.68	6.76	7.66	8.62	9.38	9.75	9.96	
30	0.01	0.13	0.45	0.82	1.19	1.45	1.69	2.23	2.75	3.13	3.50	4.35	5.61	6.66	7.54	8.47	9.27	9.67	9.91	

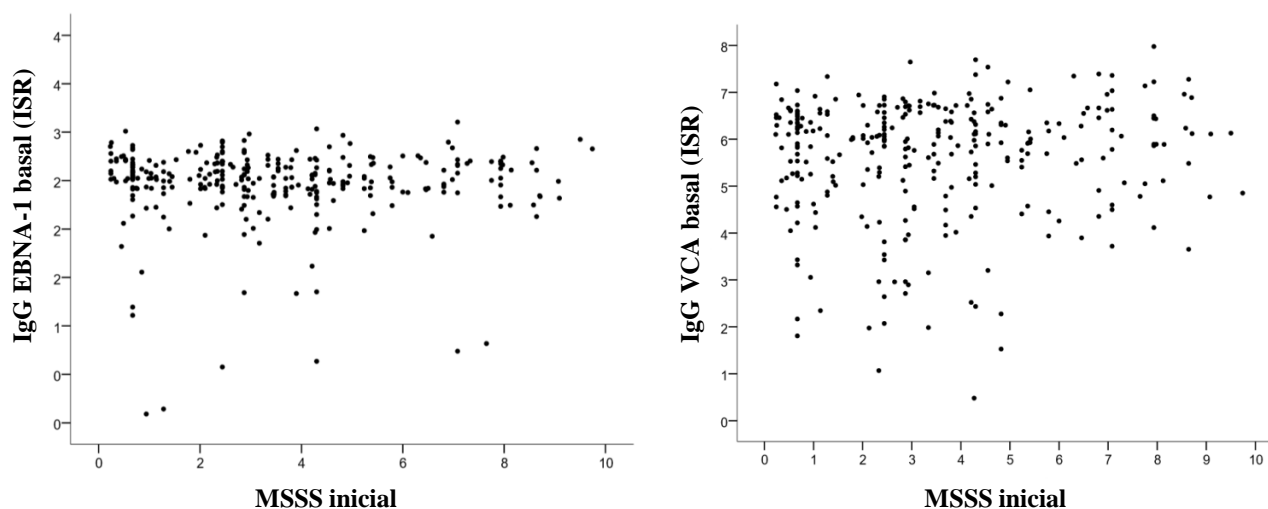
Years

=1st Decile  
 =2nd Decile  
 =3rd Decile  
 =4th Decile  
 =5th Decile

=6th Decile  
 =7th Decile  
 =8th Decile  
 =9th Decile  
 =10th Decile

**Figura 11.** Puntuación de la severidad de la EM, Global Multiple Sclerosis Severity Scores (MSSS), extraído de S.J Sawcer et al. (130).

Al valorar la correlación entre los valores basales de los anticuerpos estudiados y el MSSS de inicio, no se obtuvo una correlación lineal (figura 12), (al igual que con las variables anteriores),  $\rho = -0,077$  para el antígeno EBNA-1 y  $\rho = 0,055$  para el VCA.



**Figura 12.** Valores de IgG basales frente a EBNA-1 y VCA en relación con el MSSS inicial.

Teniendo en cuenta los valores de anticuerpos basales frente a los antígenos de interés según el sexo, no se encontraron diferencias significativas, resultando una mediana de 2,5 (2,4-2,7) en el caso de las IgG frente a EBNA-1 tanto para hombres como para mujeres, y una mediana de 5,9 (4,9-6,5) para hombres y 6,0 (5,2-6,6) para mujeres en el caso de VCA. Este contraste fue realizado con la prueba de Mann-Whitney obteniendo un p-valor = 0,730 para EBNA-1 y p= 0,131 para VCA.

## 2. Análisis de la posible implicación del EBV en la evolución de la EM-RR.

Se realizó el cálculo del porcentaje de variación para los niveles de IgG frente a EBNA-1 y VCA en los dos años del tratamiento (siempre considerando el ISR para expresar los valores de IgG, cuyo cálculo está explicado en el apartado 9 de material y métodos). El % de variación se determinó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{valores de IgG tras 24 meses de tratamiento} - \text{valores de IgG previos al tratamiento}}{\text{valores de IgG previos al tratamiento}} \times 100$$

Dado que algunos pacientes no disponían de muestra extraída a los 24 meses sino  $24 \pm 4$  meses se ajustó dicho % de variación dividiendo entre el número de meses exacto hasta la extracción de la muestra considerada final del estudio de los dos años, obteniendo la variable % de variación/mes.

Para valorar la progresión de la enfermedad se tuvo en cuenta la variable de discapacidad EDSS previa al tratamiento y tras el periodo de seguimiento del estudio (tal y como se explica en el apartado 3 de material y métodos). Según esta valoración de la progresión, en 55 de los 325 pacientes (16,9%) hubo progresión de la enfermedad mientras que en los 270 restantes (83,1%) no hubo progresión.

Por tratamientos la progresión fue la indicada en la tabla 2.

Tratamiento	Nº pacientes	Pacientes con progresión	Pacientes sin progresión
natalizumab	112	20 (17,9%)	92 (82,1%)
AG	82	15 (18,3%)	67 (81,7%)
IFN- $\beta$	131	20 (15,3%)	111 (84,7%)

**Tabla 2.** Progresión de la enfermedad según el tratamiento empleado.

Para considerar la respuesta clínica al tratamiento se estableció el criterio explicado en el apartado 3 de material y métodos, teniendo en cuenta el número de brotes durante los dos años del tratamiento y la progresión de la enfermedad citada anteriormente. Se obtuvo así que 229 de los 325 pacientes (70,5%) respondieron al tratamiento, frente a los 96 (29,5%) que no respondieron. La tasa de respuesta según los tratamientos se mantuvo como indica la tabla 3.

Tratamiento	Nº pacientes	Respuesta al tratamiento	No respuesta al tratamiento
natalizumab	112	78 (69,6%)	34 (30,4%)
AG	82	55 (67,1%)	27 (32,9%)
IFN- $\beta$	131	96 (73,3%)	35 (26,7%)

**Tabla 3.** Tasa de respuesta al tratamiento.

Algunos de los pacientes presentaron anticuerpos frente al tratamiento natalizumab. De los 112 pacientes con este tratamiento, 95 no presentaban estos anticuerpos neutralizantes frente a 5 que sí los presentaban, de los otros 12 restantes no se disponía de resultados para ser valorados.

En el caso de los anticuerpos neutralizantes del IFN- $\beta$ , de los 131 pacientes de este estudio no se disponía de resultados de 22 de ellos. En cuanto al resto, 85 no presentaban anticuerpos neutralizantes, 11 tenían valores positivos pero inferiores a 100 ,que es el valor a partir del cual se ha visto que puede interferir con el tratamiento(196), y 13 tenían valores mayores o iguales a 100.

### **2.1 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti-EBNA-1 con los brotes.**

En el estudio de la evolución de la enfermedad se tuvieron en cuenta varios factores, entre ellos el número de brotes que tenían los pacientes durante el tratamiento a lo largo de los dos años de seguimiento.

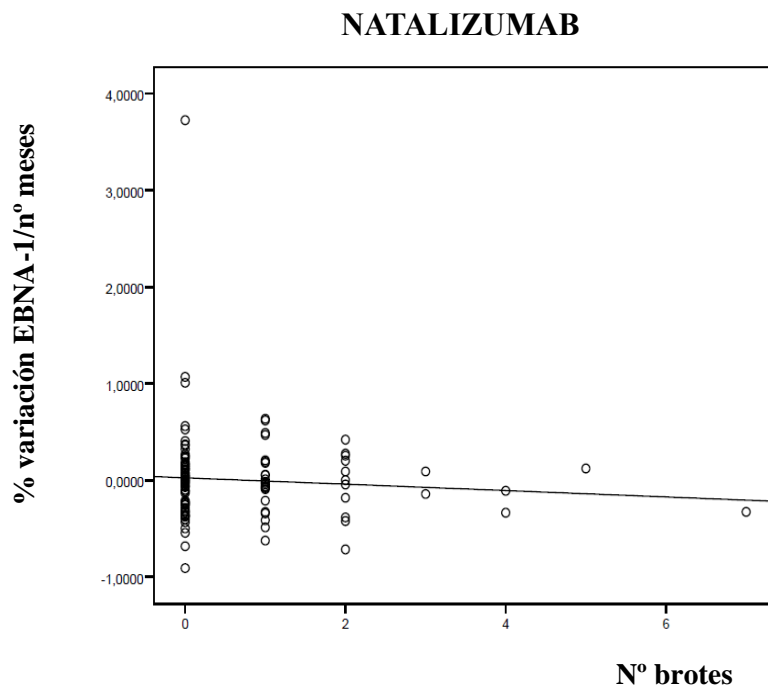
Clasificando dicho número de brotes en varias categorías 0, 1, 3 y  $\geq 3$  brotes, se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis las medianas del porcentaje de variación de los niveles de anticuerpos frente a EBNA-1, en cada uno de los tratamientos

estudiados, con el número de brotes (tabla 4), no encontrándose ninguna asociación estadísticamente significativa (p-valor = 0,313).

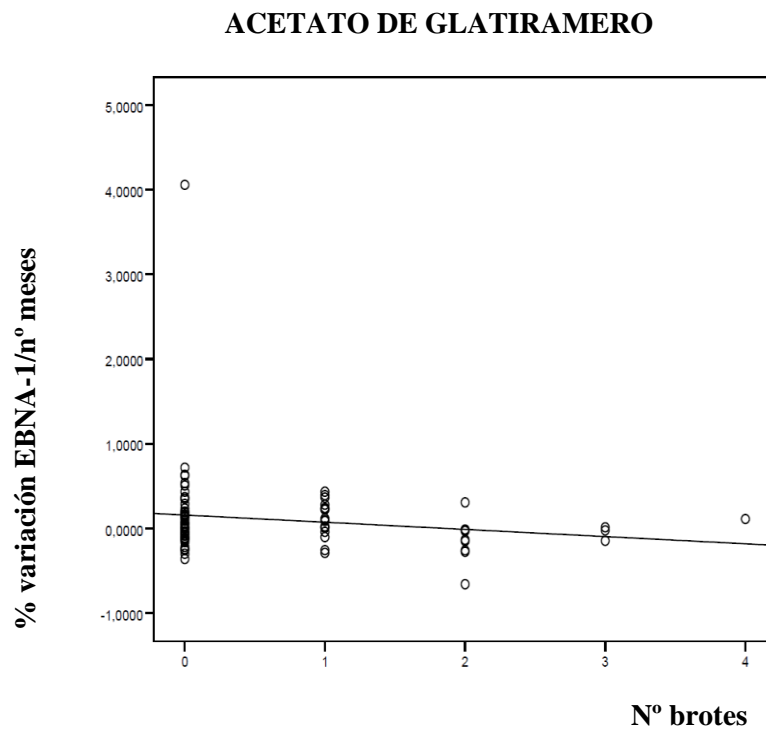
	<b>NATALIZUMAB</b>	<b>AG</b>	<b>IFN-<math>\beta</math></b>
<b>Brotes</b>	% variación/mes EBNA-1	% variación/mes EBNA-1	% variación/mes EBNA-1
<b>0</b>	-0,003	0,040	0,075
<b>1</b>	-0,027	0,097	0,052
<b>2</b>	0,003	-0,135	-0,027
<b><math>\geq 3</math></b>	-0,125	-0,006	0,095

**Tabla 4.** *Medianas de los porcentajes de variación/mes de los niveles de IgG anti-EBNA-1 distribuidos por brotes y tratamientos.*

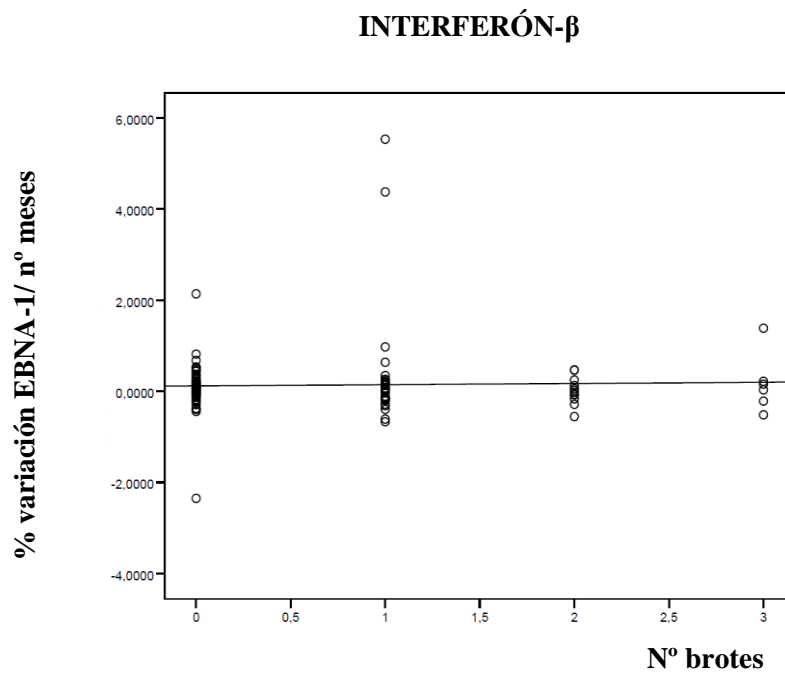
Por otra parte también se valoró la posible existencia de una correlación entre el porcentaje de variación/mes de los niveles de anticuerpos frente al antígeno EBNA-1 y el número de brotes (figuras 13, 14 y 15), a través del coeficiente de correlación de Spearman, no obteniendo asociación significativa para ninguno de los tratamientos estudiados.



**Figura 13.** *Correlación entre el porcentaje de variación/ mes de las IgG frente a EBNA-1 y el número de brotes durante el tratamiento natalizumab.*



**Figura 14.** *Correlación entre el porcentaje de variación/mes de las IgG frente a EBNA-1 y el número de brotes durante el tratamiento AG.*

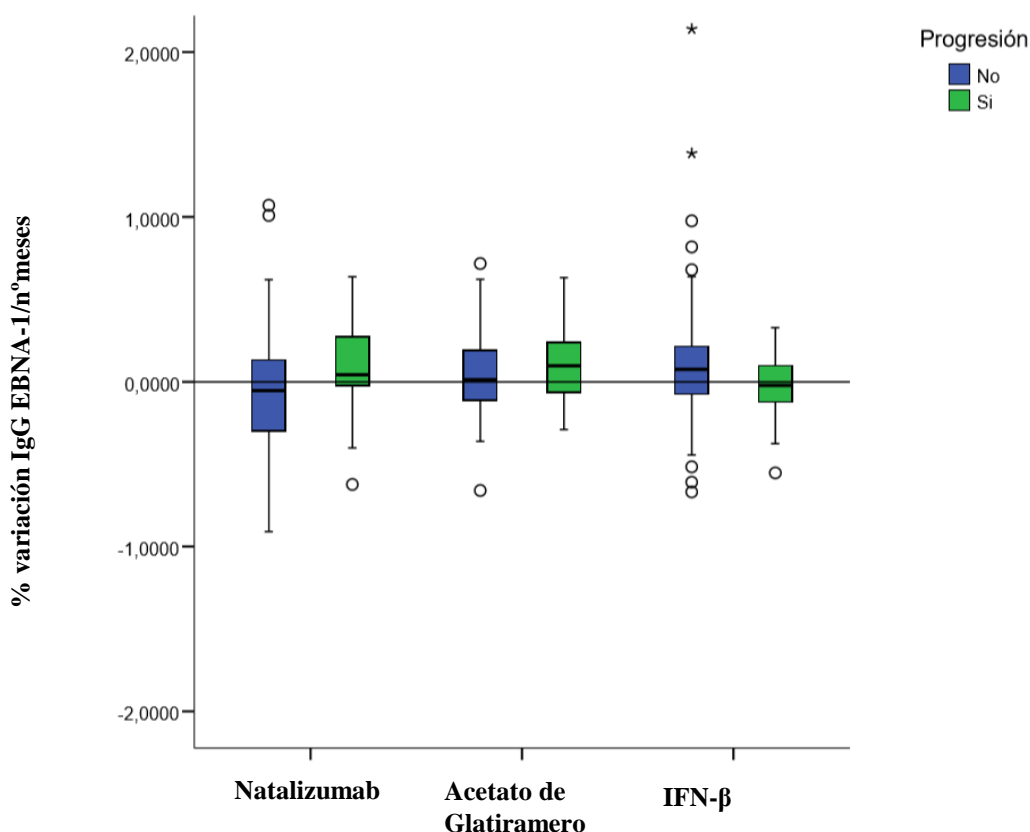


**Figura 15.** *Correlación entre el porcentaje de variación/mes de las IgG frente a EBNA-1 y el número de brotes durante el tratamiento IFN- $\beta$ .*

## 2.2 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti-EBNA-1 con la progresión.

Se analizó la relación entre la progresión de la enfermedad y el % de variación/mes de los valores ISR de las IgG anti-EBNA-1 para cada tratamiento, a través de la prueba de la mediana. El resultado fue una asociación positiva estadísticamente significativa con un p-valor de 0,043 para el tratamiento natalizumab, de tal forma que en los pacientes en los que progresaba la enfermedad el % de variación de valores de IgG anti-EBNA-1 estaba por encima de la mediana frente a los que no tenían progresión de la enfermedad. En contraposición, no resultó significativa la asociación con los tratamientos AG ni IFN- $\beta$  ( $p=0,391$  y  $p=0,082$  respectivamente).

Dichos resultados se representan en la figura 16.



**Figura 16.** Representación del % de variación IgG EBNA-1/mes y la progresión de la enfermedad según el tratamiento.

Para evitar la posible interferencia de los anticuerpos neutralizantes frente a los tratamientos, se realizó el mismo estudio basado en la prueba de la mediana pero con los pacientes que no tenían anticuerpos neutralizantes. En el caso de natalizumab, se obtuvo también una asociación positiva ligeramente más significativa que en el caso anterior con un p-valor = 0,016.

Al considerar sólo los pacientes negativos y aquéllos con valores inferiores a 100 U/mL para los anticuerpos neutralizantes del IFN- $\beta$ , eliminando los que tenían valores iguales o superiores a 100 U/mL, se mantuvo la no asociación con la progresión de la enfermedad.

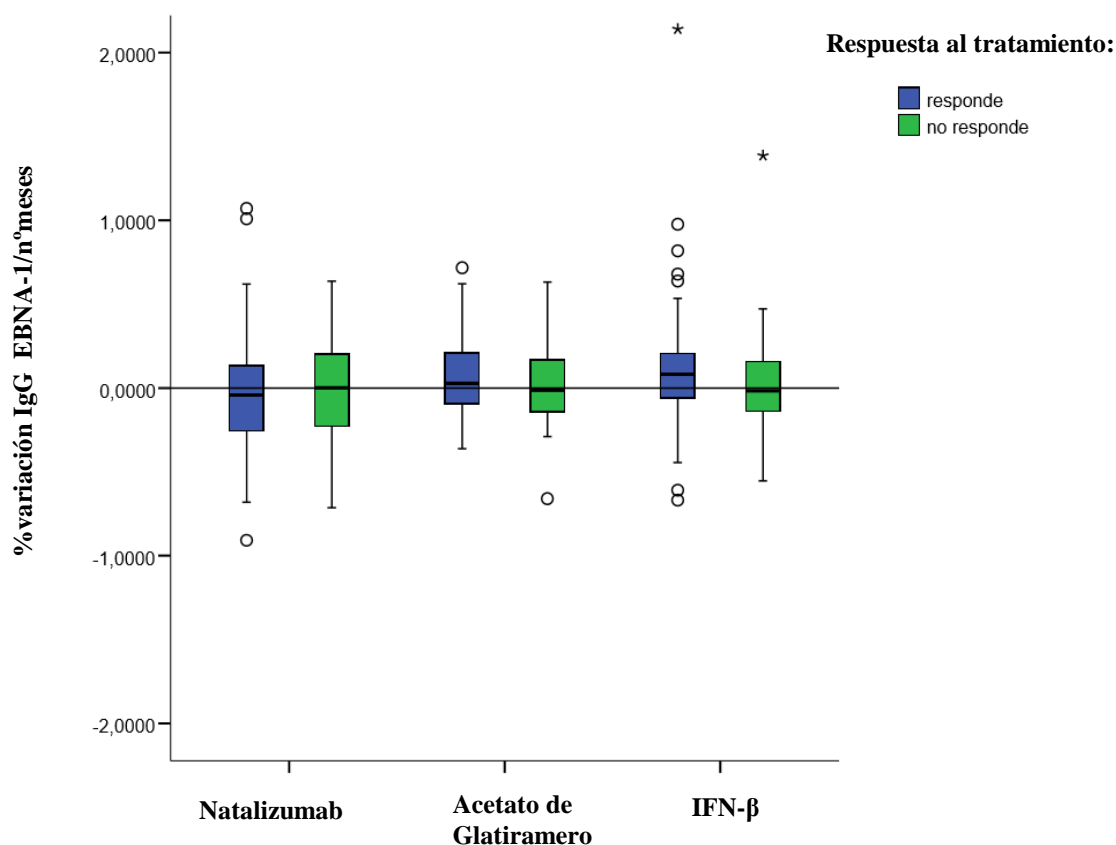
### **2.3 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti-EBNA-1 con la respuesta al tratamiento.**

Se clasificaron los pacientes en respondedores y no respondedores según el criterio presentado en el apartado 3 de material y métodos, para cada uno de los tratamientos estudiados.

A través de la prueba de la mediana se estudió la posible asociación entre el % de variación/mes de los valores de IgG anti-EBNA-1 y la respuesta clínica al tratamiento durante los dos años de seguimiento, obteniéndose resultados estadísticamente no significativos tanto para natalizumab como para AG, mientras que se encontró una asociación significativa con  $p = 0,017$  para IFN- $\beta$ . En dicha asociación se obtuvo que los pacientes que respondían al tratamiento con IFN- $\beta$  tenían un % de variación de los valores de IgG anti-EBNA-1 por encima de la mediana frente a los que no respondían al tratamiento.

Dichos resultados pueden verse en la figura 17.





**Figura 17.** Representación del % de variación IgG EBNA-1/mes y la respuesta al tratamiento.

Al igual que en el estudio de los valores de IgG anti-EBNA-1 y la progresión de la enfermedad, en este caso en relación con la respuesta al tratamiento también se hizo un segundo contraste valorando sólo los pacientes sin anticuerpos neutralizantes del natalizumab, manteniéndose el resultado de no asociación significativa (p-valor= 0.503).

Para el caso del IFN-β se eliminaron los pacientes con valores de anticuerpos neutralizantes del IFN-β positivos  $\geq 100$  U/mL obteniéndose así un resultado ligeramente significativo (p=0.059) que se confirmó al realizar el contraste sólo con aquellos pacientes que tenían valores de anticuerpos neutralizantes del IFN-β negativos (p= 0.028).

Por otra parte, se compararon a través de la prueba del  $(\chi)^2$  los porcentajes de variación de los niveles de EBNA-1 incluidos hasta el percentil 25 con los incluidos por encima del percentil 75, agrupando todos los tratamientos, para valorar las mayores subidas y bajadas de los niveles de IgG anti-EBNA-1 en función de la respuesta al tratamiento, pero no se encontró una asociación significativa (p-valor= 0.530),(tabla 5).

%variación anti-EBNA-1/mes	Responde nº pacientes (% del total)	No responde nº pacientes (% del total)	Total de pacientes
≤ percentil25	54 (66.7%)	27 (33.3%)	81 (100%)
≥percentil 75	57 (71.3%)	23 (28.8%)	80 (100%)
Total de pacientes	111 (68.9%)	50 (31.1%)	161 (100%)

**Tabla 5.** Distribución de los pacientes incluidos en el percentil 25 y 75 del porcentaje de variación anti-EBNA-1/mes, en función de la repuesta al tratamiento.

Una vez estudiadas las variaciones en los títulos de anticuerpos durante los dos años de seguimiento, se evaluó si los valores previos al inicio de los tratamientos podían estar relacionados con la futura repuesta al tratamiento. Para ello se realizó la prueba T de Student no encontrándose una asociación significativa entre ambas variables. Los valores están representados por la media y la desviación típica en la tabla 6.

Tratamiento	Respuesta	Nº pacientes	Media valores basales IgG anti-EBNA-1	Desviación típica valores basales IgG anti-EBNA-1
<b>natalizumab</b>	Responde	78	2,43	0,31
	No responde	34	2,43	0,34
<b>AG</b>	Responde	55	2,44	0,43
	No responde	27	2,53	0,20
<b>IFN-β</b>	Responde	96	2,47	0,49
	No responde	35	2,56	0,30

**Tabla 6.** Valores basales de IgG anti-EBNA-1 distribuidos en función de la respuesta al tratamiento.

## 2.4 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti-VCA con los brotes.

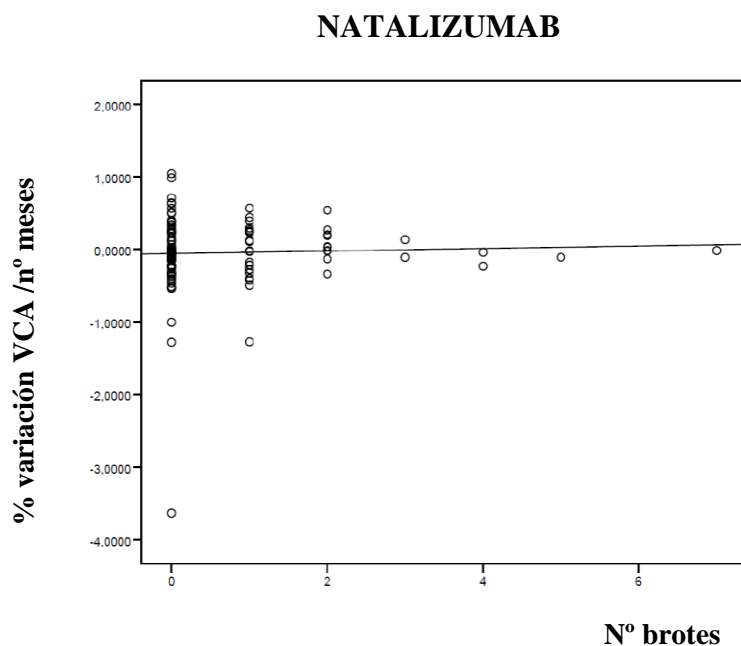
De la misma manera que se analizó la posible relación existente entre las variaciones en los títulos de anticuerpos frente a EBNA-1 y los brotes, se hizo lo mismo con el antígeno VCA.

Al igual que en el caso del otro antígeno, las variaciones de anticuerpos frente a VCA tampoco fueron relacionadas con el número de brotes durante el tratamiento en el transcurso de los dos años de seguimiento (p-valor = 0,601), tal y como se muestra en la tabla 7.

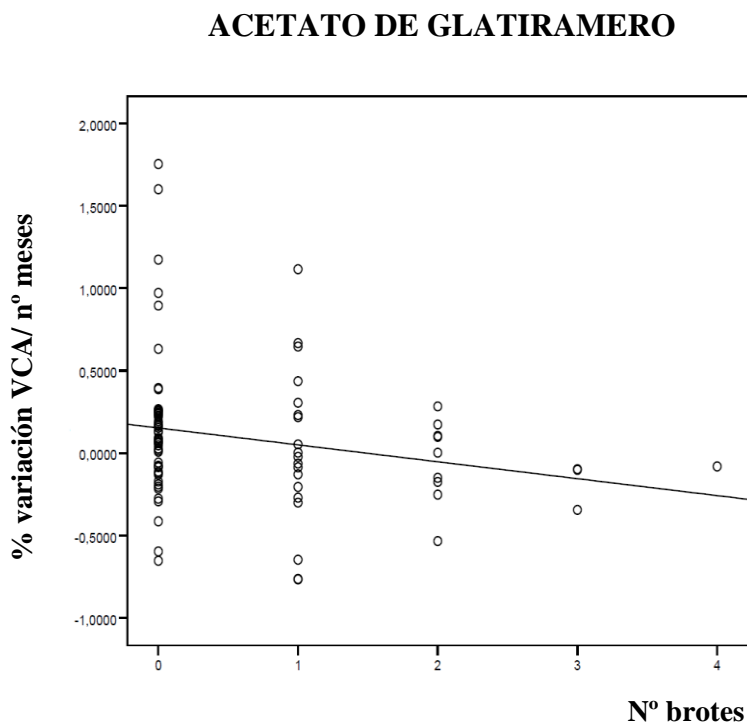
	<b>NATALIZUMAB</b>	<b>AG</b>	<b>IFN-<math>\beta</math></b>
<b>Brotes</b>	% variación/mes anti-VCA	% variación/mes anti-VCA	% variación/mes anti-VCA
<b>0</b>	-0,477	0,089	0,071
<b>1</b>	-0,019	-0,023	0,132
<b>2</b>	0,040	0,002	0,063
<b><math>\geq 3</math></b>	-0,073	-0,100	-0,104

**Tabla 7.** Medianas de los porcentajes de variación/mes de los niveles de IgG anti-VCA distribuidos por brotes y tratamientos.

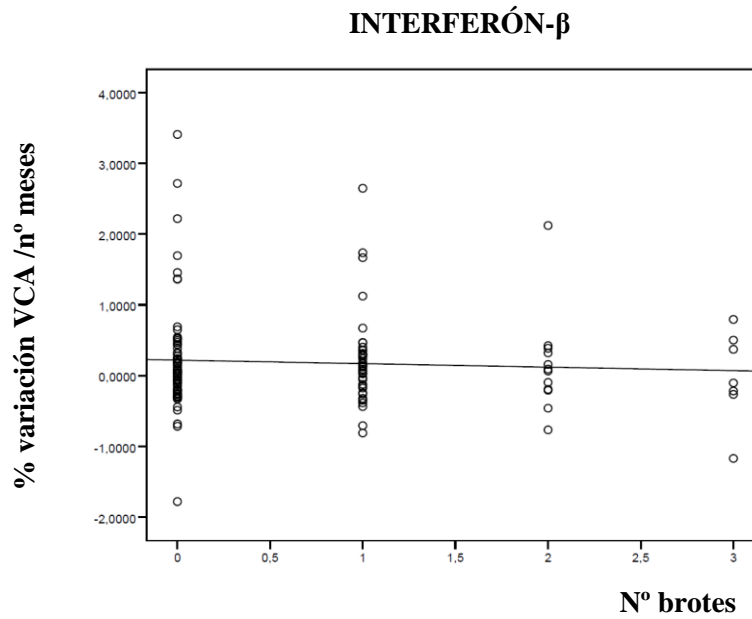
Por otra parte también se analizó la posible existencia de una correlación entre el porcentaje de variación/mes de los niveles de anticuerpos frente al antígeno VCA y el número de brotes (figuras 18, 19 y 20), a través del coeficiente de correlación de Spearman. En este caso sólo se obtuvo una débil asociación negativa significativa entre el % de variación de VCA/mes y los brotes para el tratamiento AG ( $\rho = -0.233$ ; p-valor= 0.035).



**Figura 18.** *Correlación entre el porcentaje de variación/ mes de las IgG frente a VCA y el número de brotes durante el tratamiento natalizumab.*



**Figura 19.** *Correlación entre el porcentaje de variación/ mes de las IgG frente a VCA y el número de brotes durante el tratamiento AG.*



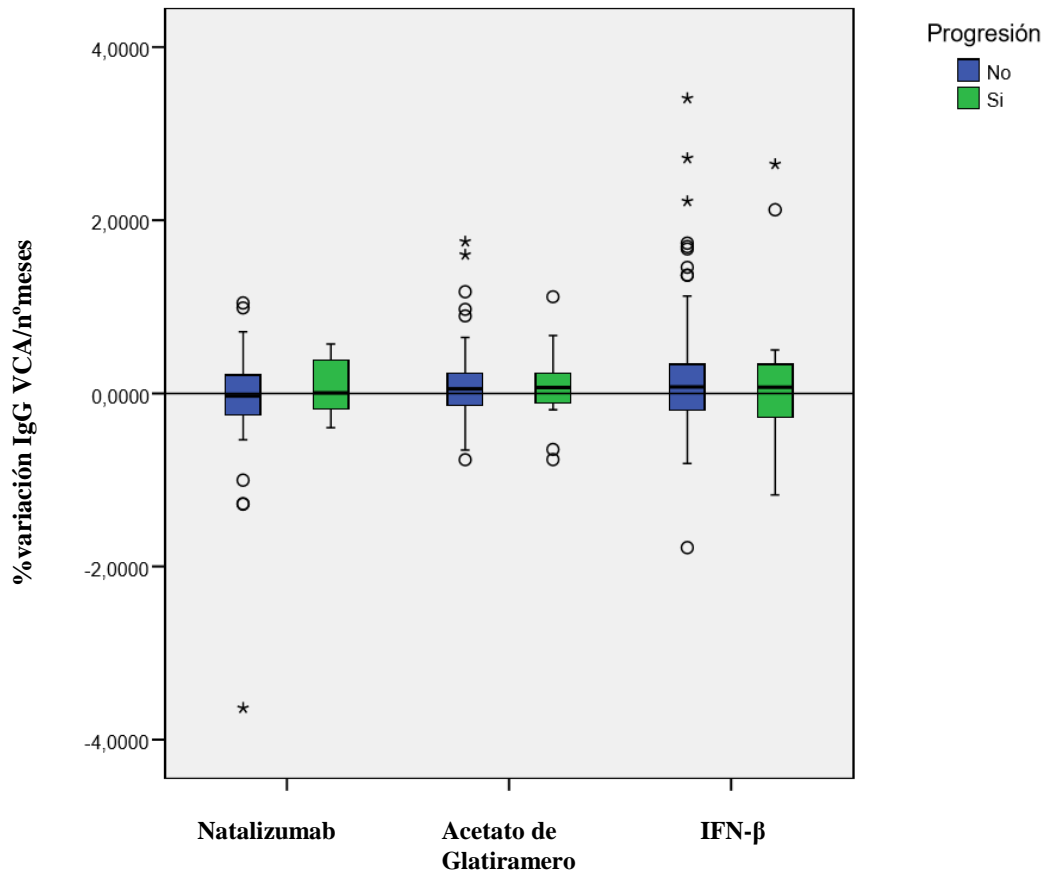
**Figura 20.** *Correlación entre el porcentaje de variación/ mes de las IgG frente a VCA y el número de brotes durante el tratamiento IFN- $\beta$ .*

### 2.5 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti-VCA con la progresión.

Los mismos contrastes basados en la prueba de la mediana empleados en el estudio de la variación de los títulos de anticuerpos frente a EBNA-1 y la progresión, fueron utilizados para comparar los valores del % de variación/mes de las IgG anti-VCA con la progresión de la enfermedad.

Como puede verse en la figura 21 no hubo asociación entre el % de variación de las IgG anti-VCA y la progresión para ninguno de los tratamientos estudiados. Los p-valoros obtenidos con la prueba de la mediana fueron  $p=0.590$  para natalizumab,  $p=0.775$  para AG y  $p=0.654$  para el IFN- $\beta$ .

## Resultados



**Figura 21.** Representación del % de variación/mes de las IgG anti-VCA y la progresión de la enfermedad por tratamientos.

Al igual que para el estudio de las IgG contra el antígeno EBNA-1, en el caso del VCA también se realizó una segunda comparación para ver posibles interferencias con los anticuerpos neutralizantes. De tal modo que se eliminaron los pacientes con anticuerpos neutralizantes del natalizumab y los pacientes con valores de anticuerpos neutralizantes del IFN-β  $\geq 100$  U/mL, y con el mismo tratamiento estadístico tampoco se encontró una relación significativa entre el % de variación/mes de IgG anti-VCA y la progresión de la enfermedad, con p-valores de  $p=0.789$  y  $p=0.779$  respectivamente. Dicho resultado no significativo también se observaba si se consideraban sólo los pacientes sin anticuerpos neutralizantes del IFN-β.

## **2.6 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti-VCA con la respuesta al tratamiento.**

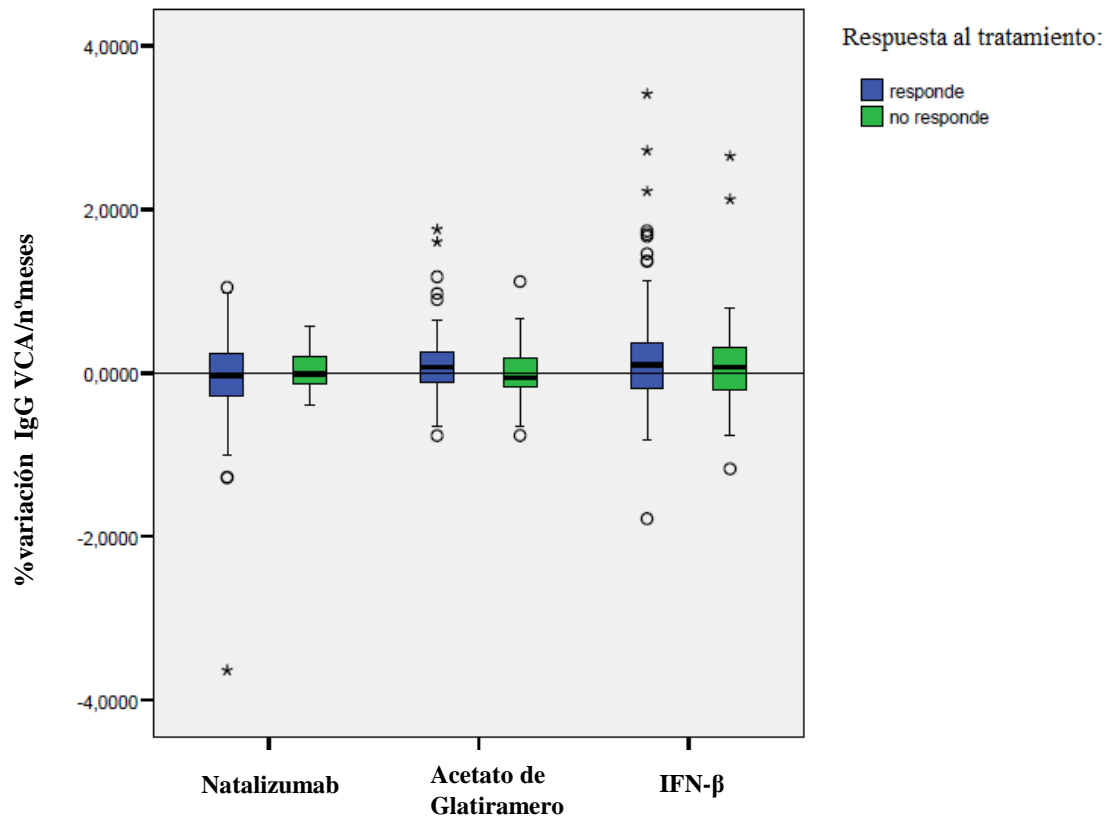
Al igual que en el estudio de las variaciones de las IgG anti-EBNA-1 frente a la respuesta al tratamiento, se contrastaron las variaciones de las IgG anti-VCA frente a los tres tratamientos estudiados por medio del test de la mediana como en los análisis anteriores.

No se obtuvo una relación estadísticamente significativa entre los aumentos o disminuciones de los valores de IgG anti-VCA y la respuesta al tratamiento con p-valores de  $p=0.375$  para natalizumab,  $p=0.481$  para AG y  $p=0.350$  para IFN- $\beta$ .

Tras descartar los pacientes con anticuerpos frente a natalizumab para evitar una posible interferencia en la respuesta al tratamiento, así como los pacientes con NABs positivos para el IFN- $\beta$ , se obtuvieron resultados estadísticamente similares.

En la figura 22 están representados los datos de variación de las IgG anti-VCA clasificados por tratamiento y respuesta al mismo.

## Resultados



**Figura 22.** Representación del % de variación/mes de las IgG anti-VCA y la respuesta al tratamiento.

Al igual que en el estudio de los anticuerpos anti-EBNA-1, también se valoraron los porcentajes de variación/mes de los niveles de IgG anti-VCA en función de la respuesta al tratamiento (agrupando todos los tratamientos estudiados) entre las variaciones incluidas en el percentil 25 y 75. No se encontró un resultado significativo para esta asociación ( $p\text{-valor}= 1$ ) (Tabla 8).



%variación anti-VCA/mes	Responde nº pacientes (% del total)	No responde nº pacientes (% del total)	Total de pacientes
≤ percentil 25	59 (72.8%)	22 (27.2%)	81 (100%)
≥ percentil 75	59 (72.8%)	22 (27.2%)	81 (100%)
Total de pacientes	118 (72.8%)	44 (27.2%)	162 (100%)

**Tabla 8.** Distribución de los pacientes incluidos en el percentil 25 y 75 del porcentaje de variación de las IgG anti-VCA/mes, en función de la respuesta al tratamiento.

Con la misma intención que en el caso del antígeno EBNA-1, se analizó si los valores previos al inicio de los tratamientos de las inmunoglobulinas anti VCA podían estar relacionados con la futura respuesta al tratamiento, no encontrándose significación estadística para ninguno de ellos a través de la prueba T de Student. Los valores se representan en la tabla 9.

Tratamiento	Respuesta	Nº pacientes	Media valores basales IgG anti-VCA	Desviación típica valores basales IgG anti-VCA
<b>natalizumab</b>	Responde	78	5,87	1,24
	No responde	34	5,99	0,80
<b>AG</b>	Responde	55	5,62	1,25
	No responde	27	5,52	1,29
<b>IFN-β</b>	Responde	96	5,43	1,34
	No responde	35	5,25	1,30

**Tabla 9.** Valores basales de IgG anti-VCA distribuidos en función de la respuesta al tratamiento.

**3. Estudio de los niveles de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA del EBV previos a cualquier tratamiento, con las variantes alélicas del HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1.**

En el estudio genético se consideraron un total de 306 pacientes con muestras extraídas en el mismo momento que la obtenida para el análisis serológico de las inmunoglobulinas estudiadas. De estos 306 pacientes no se disponía de datos genéticos de todos ellos y por tanto para analizar las variantes alélicas del HLA se consideró diferente número de pacientes en función de la variante a estudiar.

En el caso del HLA-IA se disponía de datos referentes a 33 pacientes de la población estudiada, mientras que para la variante HLA-IB se contaba con datos de 58 pacientes. Las combinaciones alélicas de cada subtipo están reflejadas en la tabla 10.

*Resultados*

<b>Combinaciones alélicas HLA-IA</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
2/30	3	9,1
24/2	3	9,1
24/3	3	9,1
2/25	2	6,1
1/26	1	3,0
1/3	1	3,0
1/30	1	3,0
1/32	1	3,0
11/26	1	3,0
11/29	1	3,0
2/1	1	3,0
2/11	1	3,0
2/29	1	3,0
2/3	1	3,0
23/23	1	3,0
23/24	1	3,0
24/24	1	3,0
3/3	1	3,0
3/30	1	3,0
31/2	1	3,0
31/33	1	3,0
31/68	1	3,0
32/2	1	3,0
32/3	1	3,0
33/2	1	3,0
33/30	1	3,0

<b>Combinaciones alélicas HLA-IB</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
18/18	4	6,9
18/35	4	6,9
14/18	3	5,2
44/8	3	5,2
14/7	2	3,4
15/44	2	3,4
18/44	2	3,4
18/57	2	3,4
35/7	2	3,4
7/18	2	3,4
7/7	2	3,4
14/35	1	1,7
14/44	1	1,7
14/45	1	1,7
15/47	1	1,7
15/50	1	1,7
15/7	1	1,7
18/41	1	1,7
18/50	1	1,7
18/53	1	1,7
27/13	1	1,7
27/39	1	1,7
27/44	1	1,7
27/7	1	1,7
35/39	1	1,7
35/44	1	1,7
35/51	1	1,7
39/51	1	1,7
40/44	1	1,7
40/7	1	1,7
44/51	1	1,7
44/7	1	1,7
50/55	1	1,7
51/51	1	1,7
7/39	1	1,7
7/50	1	1,7
7/55	1	1,7
8/35	1	1,7
8/40	1	1,7
8/41	1	1,7
8/49	1	1,7

**Tabla 10.** Distribución por frecuencias y porcentajes de las combinaciones alélicas del HLA-IA y IB

## Resultados

En ambos casos al ser una muestra con tan pocos individuos no se hizo un análisis estadístico puesto que no sería significativo de la población de estudio.

El estudio estadístico del HLA-II en relación con los niveles de inmunoglobulinas se pudo realizar para las tres variantes analizadas: HLA-DR, HLA-DQA y HLA-DQB, dado que se disponía de datos de 267, 251 y 253 individuos respectivamente, de los 306 considerados para el análisis genético.

Dentro de la población estudiada, en el subtipo HLA-DR se encontraron 52 combinaciones alélicas distintas, siendo las 5 más frecuentes: 2/7; 2/3; 2/4; 2/6 y 3/4 (Tabla 11).

Combinaciones alélicas del HLA-DR	Frecuencia	Porcentaje	Combinaciones alélicas del HLA-DR	Frecuencia	Porcentaje
2/7	27	10,1	11/7	2	0,7
2/3	20	7,5	3/8	2	0,7
2/4	18	6,7	3/9	2	0,7
2/6	14	5,2	4/4	2	0,7
3/4	14	5,2	4/8	2	0,7
2/2	13	4,9	7/15	2	0,7
4/7	11	4,1	7/9	2	0,7
1/7	10	3,7	1/10	1	0,4
3/6	10	3,7	1/8	1	0,4
1/2	8	3,0	11/11	1	0,4
11/2	8	3,0	11/12	1	0,4
3/3	8	3,0	11/13	1	0,4
4/6	8	3,0	13/16	1	0,4
11/3	7	2,6	13/2	1	0,4
6/7	7	2,6	2/10	1	0,4
1/3	6	2,2	2/12	1	0,4
1/4	6	2,2	2/5	1	0,4
11/6	6	2,2	2/9	1	0,4
6/6	6	2,2	3/88	1	0,4
7/7	6	2,2	6/10	1	0,4
1/6	5	1,9	6/12	1	0,4
3/7	5	1,9	6/8	1	0,4
2/8	4	1,5	7/8	1	0,4
4/11	3	1,1	8/16	1	0,4
1/1	2	0,7	8/8	1	0,4
1/11	2	0,7	8/9	1	0,4

**Tabla 11.** Distribución por frecuencias y porcentajes de las combinaciones alélicas del HLA-DR.

Al analizar estadísticamente las 5 combinaciones más frecuentes del HLA-DR por el test  $\chi^2$  de Pearson, no se obtuvo ninguna asociación significativa con valores superiores o inferiores a la mediana ni para las IgG anti-EBNA-1 ni para las anti-VCA.

Dentro del subtipo HLA-DQA1 se encontraron 25 combinaciones alélicas diferentes, de las cuáles las 5 más frecuentes 0102/0501; 0102/0201; 0501/0501; 0301/0501 y 0102/0301 (Tabla 12) fueron posteriormente analizadas.

Combinaciones alélicas del HLA-DQA1	Frecuencia	Porcentaje	Combinaciones alélicas del HLA-DQA1	Frecuencia	Porcentaje
0102/0501	44	17,5	0101/0101	6	2,4
0102/0201	28	11,2	0201/0201	4	1,6
0501/0501	21	8,4	0103/0201	3	1,2
0301/0501	20	8,0	0103/0301	3	1,2
0102/0301	19	7,6	0501/0401	3	1,2
0102/0102	18	7,2	0101/0103	2	0,8
0101/0501	13	5,2	0102/0103	2	0,8
0201/0301	13	5,2	0201/0102	2	0,8
0101/0102	12	4,8	0301/0301	2	0,8
0101/0201	12	4,8	0201/0401	1	0,4
0101/0301	7	2,8	0401/0102	1	0,4
0103/0501	7	2,8	0401/0601	1	0,4
0201/0501	7	2,8			

**Tabla 12.** Distribución por frecuencias y porcentajes de las combinaciones alélicas del HLA-DQA1

Para valorar si alguna de estas 5 combinaciones más frecuentes estaba asociada a valores más altos o más bajos de los niveles de IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA basales, se realizó el test  $\chi^2$  de Pearson.

Se encontró que la combinación alélica 0102/0501 estaba asociada estadísticamente, con un p-valor de 0,001, a valores por encima de la mediana de las IgG anti-EBNA-1, en estas muestras basales previas al inicio de cualquier tratamiento.

También resultó que la tercera variante alélica más frecuente 0501/0501, estaba asociada estadísticamente ( $p=0,015$ ) en este caso con valores inferiores a la mediana de dichos niveles de inmunoglobulinas anti-EBNA-1.

Por el contrario, ninguna de estas combinaciones alélicas más frecuentes estaba asociada a valores superiores ni inferiores de las IgG anti-VCA.

La última de las variantes del HLA-II analizada fue el subtipo HLA-DQB1. En este subtipo se encontraron 63 combinaciones alélicas posibles en la población estudiada (Tabla 13), de las cuáles las 5 más frecuentes 0301/0602; 0201/0602; 0202/0602; 0201/0202 y 0201/0301 fueron posteriormente analizadas como en los casos anteriores.

Combinaciones alélicas HLA-DQB1	Frecuencia	Porcentaje	Combinaciones alélicas HLA-DQB1	Frecuencia	Porcentaje
0301/0602	25	9,9	0603/0301	2	0,8
0201/0602	22	8,7	0201/0604	1	0,4
0202/0602	20	7,9	0202/0303	1	0,4
0201/0202	12	4,7	0202/0502	1	0,4
0201/0301	12	4,7	0302/0302	1	0,4
0302/0602	12	4,7	0302/0503	1	0,4
0602/0602	11	4,3	0402/0502	1	0,4
0201/0201	9	3,6	0501/0303	1	0,4
0201/0302	8	3,2	0501/0402	1	0,4
0501/0202	8	3,2	0501/0601	1	0,4
0501/0602	7	2,8	0502/0201	1	0,4
0202/0302	6	2,4	0502/0301	1	0,4
0301/0501	5	2,0	0502/0502	1	0,4
0301/0604	5	2,0	0502/0604	1	0,4
0303/0602	5	2,0	0502/0609	1	0,4
0501/0201	5	2,0	0503/0501	1	0,4
0501/0302	5	2,0	0503/0503	1	0,4
0202/0202	4	1,6	0503/0602	1	0,4
0301/0301	4	1,6	0503/0604	1	0,4
0301/0302	4	1,6	0601/0201	1	0,4
0302/0603	4	1,6	0601/0202	1	0,4
0201/0303	3	1,2	0601/0301	1	0,4
0201/0402	3	1,2	0602/0402	1	0,4
0201/0503	3	1,2	0602/0603	1	0,4
0202/0301	3	1,2	0602/0604	1	0,4
0501/0501	3	1,2	0603/0202	1	0,4
0503/0301	3	1,2	0603/0303	1	0,4
0201/0603	2	0,8	0603/0501	1	0,4
0202/0503	2	0,8	0603/0502	1	0,4
0301/0402	2	0,8	0604/0202	1	0,4
0501/0502	2	0,8	0604/0604	1	0,4
0502/0602	2	0,8			

**Tabla 13.** Distribución por frecuencias y porcentajes de las combinaciones  
alélicas del HLA-DQB1

De estas combinaciones, el subtipo DQB1\*0301/\*0602 fue asociado significativamente ( $p=0,002$ ) a valores por encima de la mediana de los niveles basales de IgG anti-EBNA-1.

Ninguna de las combinaciones alélicas del HLA-DQB1 más frecuentes fue asociada a valores superiores o inferiores de las IgG anti-VCA.

Dado que el subtipo más frecuente asociado a EM es el HLA-DRB1\*15:01, se contrastó este subtipo concreto en relación con los valores de IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA. Se obtuvo que el 37,8% de la población de este estudio presenta el subtipo concreto HLA-DRB1\*15:01 frente al 62,2% que no lo presenta. Este subtipo no se asoció estadísticamente a valores superiores o inferiores a la mediana de los niveles previos al tratamiento de IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA ( $p=0,498$  y  $p=0,338$  respectivamente según el test  $\chi^2$  de Pearson).

#### **4. Relación entre los niveles de anticuerpos IgG-anti EBNA-1 y anti-VCA del EBV basales y los SNPs analizados.**

Se tuvieron en cuenta para este análisis 306 pacientes afectados de EM-RR con muestras extraídas en la misma fecha que la muestra extraída para el análisis serológico.

Se consideraron para el estudio los datos obtenidos por el servicio de Inmunología del HCSC de Madrid de los 42 SNPs más frecuentes asociados a EM según los estudios GWAS, mencionados en el apartado de material y métodos.

En cada SNP se contrastó el presentar el alelo mutado frente al genotipo “Wild Type” (WT) no mutado, en relación con la existencia o no de valores superiores o inferiores a la mediana de los niveles basales de las inmunoglobulinas estudiadas frente a los dos antígenos del EBV. El análisis estadístico fue realizado con el test  $\chi^2$  de Pearson.



De este análisis resultó que el SNP rs11129295 fue asociado a valores más altos de los niveles basales de los anticuerpos frente a EBNA-1 (p-valor= 0,013). El 71,0% de los pacientes que tenían el genotipo no mutado (WT) para este SNP presentaban valores inferiores a la mediana para las IgG anti-EBNA-1. Entre los individuos con la mutación en alguno de sus dos alelos el 52,7% presentaba valores por encima de la mediana.

Otro de los polimorfismos de los que se obtuvo una asociación significativa con los valores basales superiores a la mediana de las IgG anti-EBNA-1 (p-valor=0,036) fue el SNP rs12212193. El 52,6% de los pacientes con la mutación en este SNP presentaban valores por encima de la mediana. Dentro de los individuos sin la mutación el 61,6% presentaban valores inferiores a la mediana.

Al igual que con los dos polimorfismos anteriores también se encontró un resultado significativo (p=0,035) para el SNP rs17174870. Entre los individuos con el alelo mutado para este SNP el 57,8% tenía niveles superiores a la mediana para las IgG basales anti-EBNA-1. Entre los pacientes sin el genotipo mutado el 55,7% presentaba valores inferiores a la mediana.

Al valorar los datos genotípicos de estos polimorfismos frente a los valores basales de IgG anti-VCA, se encontró una asociación significativa entre el SNP rs1738074 con niveles superiores a la mediana para dichas inmunoglobulinas (p=0,023). El 57,5% de los pacientes con la mutación tenían valores superiores a la mediana. Asimismo, dentro de los pacientes con el genotipo no mutado WT el 56,3% tenían valores por debajo de la mediana.

## 5. Estudio de los individuos control.

### 5.1 Estudio de la posible asociación de los niveles de anticuerpos IgG frente a los antígenos EBNA-1 y VCA del EBV con los factores: sexo, edad y la variante alélica DRB1\*15:01 asociado a EM.

En la población considerada control en este estudio, formada por 295 individuos, se analizaron los valores de IgG frente a los mismos antígenos del EBV estudiados en los pacientes con EM.

Dichos valores se compararon en función del sexo (tabla14):

	<b>IgG EBNA-1 (ISR)</b> (mediana, IC)	<b>IgG VCA (ISR)</b> (mediana, IC)
<b>Mujeres</b>	2,27 (1,79-2,59)	5,51 (3,76- 6,40)
<b>Hombres</b>	2,46 (1,78-2,64)	5,58 (3,89-6,41)

***Tabla 14.** Distribución de los valores de IgG frente a los dos antígenos estudiados del EBV en función del sexo.*

Agrupando los valores en función de los que estaban por encima y por debajo de la mediana (2,41) del total del grupo control, tanto para hombres como mujeres, y aplicando posteriormente el test ( $\chi^2$ ) no se encontraron diferencias significativas entre sexos, ( $p=0,081$  para IgG frente a EBNA-1 y  $p=0,942$  para IgG frente a VCA).

También se estudió a través del coeficiente de correlación Rho ( $\rho$ ) de Spearman si existía una asociación entre la edad de los individuos control y los valores de IgG frente a ambos antígenos del EBV, no obteniendo una correlación estadísticamente significativa, con un coeficiente de correlación de ( $\rho$ ) = 0,046 para EBNA-1 y ( $\rho$ ) = 0,111 para VCA.

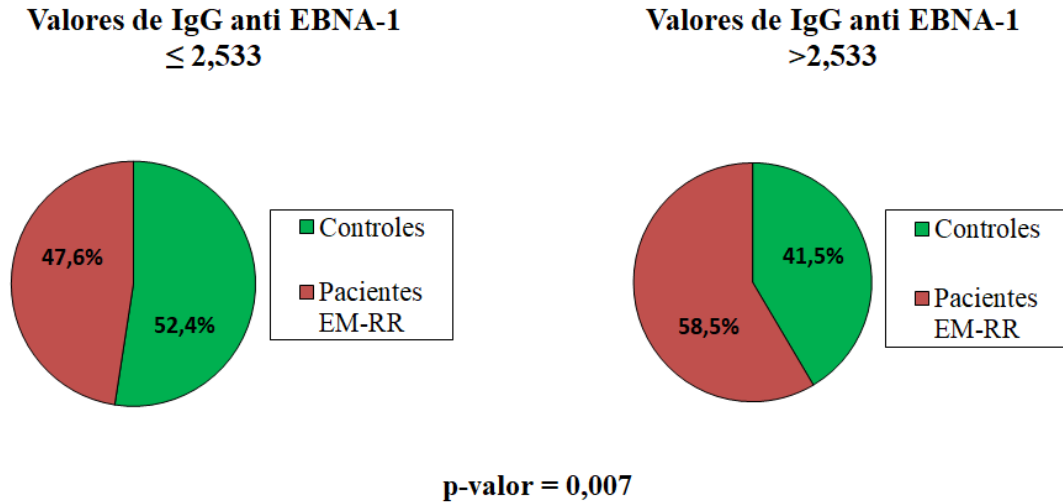
El último de los análisis que se realizó en el grupo control fue el alelo DRB1\*15:01. De los 295 individuos control se disponía del análisis de dicho alelo en 270 individuos. De ellos, 226 (83,7%) no presentaban el alelo DRB1\*15:01 frente a 44 (16,3%) en los que estaba presente ya fuese en homo o heterocigosis.

Al realizar el contraste ( $\chi^2$ ) resultó que los individuos control que carecían del alelo DRB1\*15:01 tenían valores de IgG frente a EBNA-1 por debajo de la mediana del grupo control, mientras que los que presentaban uno o los dos alelos del DRB1\*15:01 presentaban valores superiores a dicha mediana, con un p-valor de 0,037.

Al analizar las IgG frente a VCA y el alelo DRB1\*15:01, a pesar de que la tendencia era la misma que para las IgG frente a EBNA-1, no resultó estadísticamente significativo ( $p=0,170$ ).

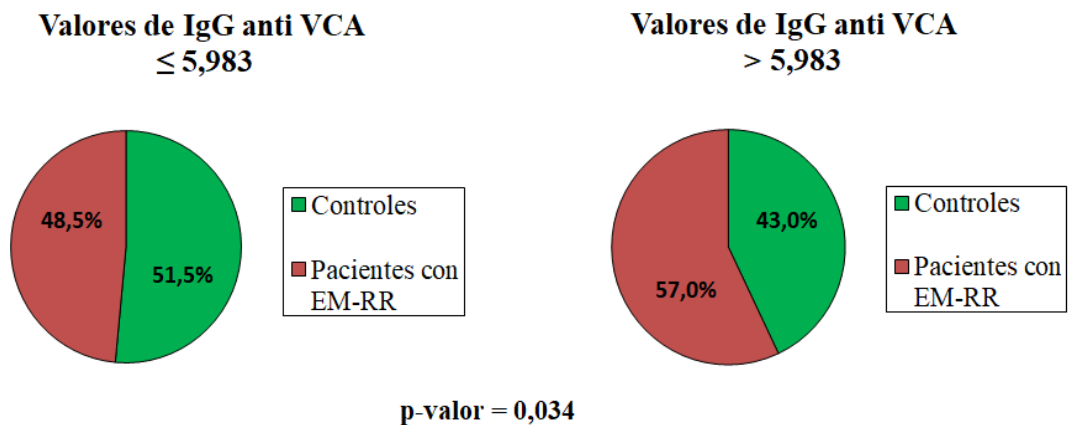
## **5.2. Comparación entre individuos control y pacientes con EM.**

Al realizar el estudio comparativo entre los individuos control y los pacientes con EM-RR, y considerando como punto de corte la mediana 2,533 para las IgG frente a EBNA-1 y 5,983 para las IgG frente a VCA del grupo de pacientes, se encontró que los pacientes estaban asociados a valores de IgG frente a EBNA-1 superiores a la mediana mientras que los individuos control se asociaban a valores de IgG frente al mismo antígeno por debajo de la mediana considerada (Figura 23). Todo ello con un p-valor estadísticamente significativo de 0,007 con el test ( $\chi^2$ ).



**Figura 23.** Porcentajes de los individuos control y de los pacientes con EM-RR con valores superiores o inferiores a la mediana de las IgG anti-EBNA-1

En el caso de las inmunoglobulinas frente a VCA resultó igualmente estadísticamente significativo ( $p=0,034$ ) la asociación de los valores superiores a la mediana con los pacientes y los valores inferiores con los individuos control (Figura 24).



**Figura 24.** Porcentajes de los individuos control y de los pacientes con EM-RR con valores superiores o inferiores a la mediana de las IgG anti-EBNA-1

## **DISCUSIÓN**



## **DISCUSIÓN**

La EM, al ser una enfermedad multifactorial, continúa siendo en cierto modo desconocida a pesar de que el comienzo de su estudio data de mediados del siglo XIX cuando fue descubierta en 1868 por Jean-Martin Charcot (197)(198) . Desde entonces han sido muchos los estudios que se han realizado para tratar de conocer su etiología y los posibles tratamientos para reducir la progresión de la patología.

Actualmente se cree que los factores que pueden desencadenar la enfermedad son múltiples, por lo que en nuestro estudio nos hemos centrado en el componente ambiental de la infección por el EBV, que ha cobrado importancia en los últimos años. Asimismo, lo hemos relacionado con características genéticas para analizar posibles asociaciones entre ambos factores.

### **1. Análisis de los niveles basales de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA en relación con los factores edad, sexo, duración de la enfermedad y MSSS.**

El estudio de los niveles de inmunoglobulinas basales frente a los antígenos EBNA-1 y VCA en función de la edad, tiene como objetivo valorar la posibilidad de que los pacientes, según la edad, tuviesen diferente respuesta al virus, y por tanto pudieran presentar niveles más altos o más bajos de anticuerpos.

En algunos estudios como el de K. L. Munger et al.(199), el de G. Ingram et al. (200) o el de René M. Gieß et al. (201), analizaron dicho contraste y demostraron, al igual que nosotros, la falta de correlación entre los valores de inmunoglobulinas frente a los antígenos estudiados y la edad de los pacientes.

Otro de los estudios con similares resultados fue el de Tarek H. Mouhieddine et al. (202). A pesar de que en su estudio el análisis serológico fue realizado mediante quimioluminiscencia en lugar de enzimoimmunoanálisis como ha sido nuestro caso, tampoco obtuvieron ninguna asociación entre los niveles de IgG anti-EBNA-1 o anti-VCA en pacientes con EM y la edad. Sólo obtuvieron significación estadística con la edad en el caso del análisis multivariante, junto con otros factores de riesgo como los niveles bajos de vitamina D o el hábito tabáquico.

Por todo ello parece posible que la edad de los pacientes no esté relacionada con la respuesta al virus y por tanto no influya en los títulos de anticuerpos que presentan los individuos del estudio.

Dado que la prevalencia de casos con EM es superior en mujeres que en hombres, estando en torno a 3:1 como demuestran las últimas publicaciones (203), hemos considerado la comparación de los títulos de anticuerpos frente al EBV en ambos sexos para analizar si dicha diferencia en la prevalencia también quedaba reflejada en los valores de anticuerpos en función del sexo. Pero los resultados obtenidos mostraron valores semejantes en la mediana de hombres y mujeres, 2,5 (2,4-2,7) en el caso de las IgG anti-EBNA-1, y muy similares en las IgG anti-VCA siendo 5,9 (4,9-6,5) para hombres y 6,0 (5,2-6,6) para mujeres, demostrando así, que en la población analizada la respuesta al EBV no depende del sexo. Similares resultados se desprenden del estudio de K. L. Munger (199) en el que no hay diferencias por sexo en los niveles de estos anticuerpos frente a EBNA-1.

A pesar de ello, estos resultados están en contraposición con el obtenido en estudios como el de Rabeah Al-Temaimi et al. (204) en el que los títulos de estos anticuerpos eran más altos en hombres respecto a las mujeres con EM. Además, los hombres tenían una progresión más severa de la enfermedad. Concluían por tanto que



existe la posibilidad de que la respuesta inmunológica al ser diferente en ambos sexos pueda influir en que las mujeres presenten más tendencia a enfermedades autoinmunes como la EM, pero de alguna manera su respuesta inmunológica sea un factor de protección frente a la progresión de la enfermedad.

.

No obstante, en función de nuestro estudio y de gran parte de las publicaciones existentes, no existe un consenso en cuanto a los resultados obtenidos en relación a la presencia o no de correlación entre el sexo del paciente y los valores de las inmunoglobulinas de interés.

Otro de los factores estudiados en relación con los niveles de anticuerpos anti-EBNA-1 y anti-VCA fue la duración de la enfermedad hasta la extracción de la muestra considerada basal. Con dicho análisis se pretendía determinar si el presentar la enfermedad durante más años podía estar asociado a que los niveles de estos anticuerpos estuviesen más o menos elevados. Tras el estudio estadístico comprobamos que no existía ninguna correlación entre ambas variables, al igual que concluyeron otros estudios como el de Massimiliano Castellazzi et al. (205) o en el de G. Ingram et al. (200) mencionado anteriormente para la correlación con la edad. Por tanto, a partir de nuestros resultados no podríamos concluir que la duración de la enfermedad tenga algún efecto en la respuesta del sistema inmune de los pacientes con EM frente al virus.

Además de la duración de la enfermedad, en la EM influye también la progresión de la misma, por ello una forma de valorar conjuntamente la duración y la progresión es el MSSS, que proporciona información sobre la severidad de la enfermedad (206). Por este motivo otro de los factores estudiados fue el MSSS de inicio que presentaban los pacientes cuando se les extrajo la muestra basal. De esta manera,

pretendíamos valorar si un paciente con una forma más severa de la enfermedad previo al comienzo del tratamiento tenía valores más altos de los anticuerpos de interés que otro en el que la EM fuese más leve. Pero tras el análisis estadístico no pudimos establecer una correlación entre ambas variables, al igual que en otros estudios como el de G. Ingram et al. (200) en el que estudiaron los anticuerpos frente al EBNA-1 en función del MSSS, obteniendo el mismo resultado que nosotros.

## **2. Análisis de la posible implicación del EBV en la evolución de la EM-RR.**

### **2.1 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti EBNA-1 y anti-VCA con los brotes.**

Puesto que los brotes durante la enfermedad son uno de los factores a considerar para valorar la evolución de la EM, estudiamos la posibilidad de que hubiese alguna relación entre el factor aislado brotes (sin considerar las variaciones en la escala de discapacidad EDSS) y los valores de las inmunoglobulinas frente a los antígenos de interés.

Al igual que nosotros, Horakova, D et al. (207) no encontraron una asociación estadísticamente significativa al comparar, en su caso, los valores de los anticuerpos frente a EBNA-1 y VCA del cuartil más alto con el número de brotes de la enfermedad.

En nuestro caso tampoco hallamos ninguna asociación entre los valores más elevados (por encima de la mediana) de las inmunoglobulinas estudiadas con relación al número de brotes, en ninguno de los tratamientos estudiados, así como tampoco ninguna correlación entre ambas variables, salvo en el caso de los anticuerpos anti VCA. Para estos anticuerpos IgG anti-VCA se encontró una débil correlación negativa con el número de brotes, pero a pesar de ser significativo el p-valor, el coeficiente de correlación obtenido está muy alejado de  $\pm 1$  ( $\rho = -0.233$ ) por lo que no puede

considerarse una correlación efectiva por ser una correlación muy débil. Lo cual indica que ni los títulos de anticuerpos IgG frente a EBNA-1 y/o VCA se asocian con la aparición de brotes en el transcurso de la enfermedad, ni los brotes, en sí mismos, parecen alterar los valores de dichos anticuerpos.

## **2.2 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti EBNA-1 y anti-VCA con la progresión.**

Algunos estudios, como el de R. Zivadinov et al. (208), han relacionado el EBV con la progresión de la enfermedad. Realizaron la comparación de los niveles de anticuerpos IgG frente a varios antígenos del EBV como el EBNA-1, VCA y el antígeno temprano (EA), con respecto a parámetros clínicos como la fracción de sustancia gris, sustancia blanca y la fracción de parénquima cerebral total, así como el volumen de lesiones en T1 y T2, medido con resonancia magnética. Llegaron a la conclusión de que los valores iniciales elevados de IgG frente a VCA estaban asociados a pérdida del parénquima cerebral, menor fracción de sustancia gris y aumento del volumen de lesiones en T1 y T2 y por tanto proponían la relación del virus con la progresión de la enfermedad.

Jan D. Lünemann et al. en su estudio (209), también concluyeron tras analizar los anticuerpos frente a varios antígenos virales durante un periodo de seguimiento de hasta cinco años, que el antígeno EBNA-1 del EBV estaba relacionado con la progresión de la enfermedad, medida en función de las variaciones en la escala EDSS, así como con las lesiones estudiadas por resonancia magnética. Resultados similares a los publicados por R. Farrell et al. (210)

En los pacientes con EM las inmunoglobulinas que se encuentran elevadas en más del 98% de los pacientes son las IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA, a diferencia de las

IgM anti-VCA que se encuentran elevadas en un porcentaje muy bajo de los pacientes (2%) (205)(211). Dado que las IgM indican una infección aguda o una reactivación de la misma no parece que la reactivación del EBV sea un fenómeno importante en el curso de la enfermedad.

Por el contrario las IgG se mantienen elevadas de por vida tanto para EBNA-1 como VCA, por ello nuestro análisis se centró en valorar los niveles de IgG frente a ambos antígenos.

De tal manera que estudiamos la posible relación entre la progresión de la enfermedad, considerada como variaciones en la escala de discapacidad EDSS, con respecto a las variaciones en los niveles de las IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA.

No hallamos ninguna asociación entre estas variables en los pacientes en tratamiento con AG ni IFN- $\beta$ . Tampoco hubo relación entre los niveles de IgG frente a VCA y la progresión de la enfermedad en los pacientes tratados con natalizumab. Pero en cambio, cuando analizamos los resultados de las IgG frente a EBNA-1 para este fármaco, obtuvimos que los pacientes en los que progresaba la enfermedad tenían unos valores más elevados de estos anticuerpos tras los dos años de tratamiento.

Desconocemos el motivo, pero quizá esa diferente evolución se deba a que el antígeno VCA al expresarse durante el ciclo replicativo lítico del virus sea más característico del proceso de reactivación viral.

Por el contrario el EBNA-1 regula el proceso latente del virus, uniéndose al origen de replicación oriP del genoma viral y mediando en la replicación y partición del episoma viral durante la división de la célula huésped (linfocito B) (212). Por ello, es más probable que las variaciones de los anticuerpos frente a este antígeno sean las que varíen durante la enfermedad, puesto que el ciclo latente del virus es el que predomina

en estos pacientes de acuerdo con los estudios de las inmunoglobulinas IgG e IgM comentados anteriormente.

Se ha visto además que los pacientes con EM presentan un mayor número de epítomos del antígeno EBNA-1 que pueden ser reconocidos por linfocitos T, respecto a los individuos sin la enfermedad. Esto supone una mayor activación de estos linfocitos frente al virus (213). Por el contrario esta ampliación de la respuesta inmune frente al EBNA-1 no se ha encontrado en el caso del VCA (210) . Dado que el EBNA-1 comparte secuencias similares con antígenos propios, es probable que la respuesta inmune aumentada frente a este antígeno esté implicada en el proceso autoinmune incrementado de estos pacientes, llevando consigo una desmielinización y por tanto un empeoramiento del curso de la enfermedad o lo que es lo mismo una progresión de la misma.

La asociación encontrada en aquellos pacientes tratados con natalizumab en los que progresaba la enfermedad con los niveles más elevados de IgG anti-EBNA-1, podría ser debido a que natalizumab, entre otros efectos, reduce los niveles de IgG (214).

Esta reducción en los niveles de inmunoglobulinas se cree que puede producirse porque el fármaco bloquea a la molécula VLA-4 de los LB que no puede unirse a sus moléculas diana reduciendo así la generación de células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas.

Como consecuencia de esta disminución en la producción de las IgG se verían reducidas las IgG específicas frente al EBV también. Teniendo en cuenta que una de las hipótesis consideradas hasta el momento para interpretar la patología de la enfermedad es la del mimetismo molecular, podría explicar que las similitudes entre la secuencia del antígeno EBNA-1 y la proteína básica de la mielina supusiese la reactividad cruzada

entre las inmunoglobulinas anti-EBNA-1 y dichos antígenos propios, llevando consigo el daño en el SNC propio de la progresión de la enfermedad (215). Según nuestros resultados este efecto podría ser mitigado a través del tratamiento con natalizumab.

### **2.3 Relación entre las variaciones del ISR de las IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA con la respuesta al tratamiento.**

Como se ha explicado anteriormente, considerando ambos criterios “brotes” y “progresión” se puede establecer la variable “respuesta al tratamiento”. De esta forma se pretendía valorar si los pacientes que responden peor al tratamiento tienen unos valores más elevados de las inmunoglobulinas de interés al final del estudio o viceversa.

Por tanto se valoró si existía una relación entre los niveles de IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA en función de la respuesta al tratamiento para cada uno de los tres fármacos estudiados.

En el caso de AG no se obtuvo ninguna asociación entre las variables comparadas. Lo mismo resultó con el tratamiento natalizumab, para el que tampoco se estableció ninguna relación entre los niveles de IgG frente a ambos antígenos y la respuesta al tratamiento. A diferencia de esto, obtuvimos una asociación significativa entre los niveles más bajos de las IgG anti-EBNA-1 con la falta de respuesta al tratamiento IFN- $\beta$ .

En lo referente a AG, no está claro por el momento el mecanismo de acción del fármaco, al igual que en el resto de tratamientos, a pesar de que se ha demostrado su eficacia a nivel del control de la enfermedad.

Se cree que podría actuar con un efecto directo reduciendo la expresión de las citocinas proinflamatorias y aumentando la de las antiinflamatorias, tanto las producidas por los LT como por los LB. Asimismo, parece ser que aumenta el porcentaje de monocitos antiinflamatorios y favorece la proliferación de LTreg (216).

Este mecanismo de acción al no modificar los niveles de LT citotóxicos que son los relacionados con el control del EBV, no haría fluctuar los niveles del virus y por tanto tampoco los de las IgG frente a los antígenos virales. Por este motivo se podría explicar que en nuestros resultados no se hallen diferencias en estas IgG en relación a la respuesta al tratamiento.

En el caso del tratamiento natalizumab, no se obtuvo una relación significativa entre los valores de IgG anti-EBNA-1 y la respuesta al tratamiento.

La posible explicación a esto puede ser una combinación entre el mecanismo de acción del fármaco y la situación inmuno-patológica que ocurre en la enfermedad.

Natalizumab actúa uniéndose a la subunidad  $\alpha 4$  del antígeno VLA-4, constituido por las integrinas  $\alpha 4$  (CD49d/) y  $\beta 1$  (CD29), que se encuentra sobre la superficie de los linfocitos. Dicha unión impide entre otras cosas que el LT activado se pueda unir a la molécula de adhesión vascular celular VCAM-1 del endotelio, no permitiendo que atraviese la BHE y por tanto evitando el daño en el SNC. Por tanto la forma de actuación del fármaco no supone la disminución del número de LT activos como ocurre en otros fármacos. (217)

Diversas publicaciones reflejan que el número de LT CD8+ activos frente al EBV está disminuido en el suero de pacientes con EM. Algunas de las hipótesis propuestas explican que los LTCD8+ atraviesan la BHE y quedan “secuestrados” en el compartimento central, o bien existe en los pacientes con EM un defecto genético que disminuye la formación de estos LT CD8+. Al reducirse dicha respuesta inmune periférica frente a los LB infectados por el virus, es posible que los niveles de IgG anti-EBNA-1 aumentasen. (218) (219)

Dado que el mecanismo de acción del fármaco natalizumab es reducir la extravasación de los LT al SNC, en lugar de impedir la activación de los LT CD8+, el

efecto de la respuesta al fármaco podría estar contrarrestando la elevación de las IgG anti-EBNA-1 y por tanto no se verían resultados serológicos significativos.

Por el contrario, se obtuvo una asociación significativa entre los niveles de IgG anti-EBNA-1 y la respuesta al tratamiento para IFN- $\beta$ . De tal forma que sorprendentemente los niveles de las inmunoglobulinas estudiadas eran más bajos en los pacientes que respondían peor al tratamiento tras los dos años del estudio, mientras que los que eran considerados como buenos respondedores tenían unos niveles mayores.

El motivo de estos resultados podría deberse una vez más al mecanismo de actuación que tiene el IFN- $\beta$ . Pese a que no está completamente clara su forma de actuación existen varias posibilidades por las que el fármaco contribuye a la reducción del número de brotes y severidad de la enfermedad.

Uno de los principales mecanismos propuestos se basa en que el IFN- $\beta$  disminuye la activación de los LT. Esto puede realizarse ya sea reduciendo la expresión de las moléculas MHC II necesarias para la presentación antigénica, o bien reduciendo la expresión de las moléculas coestimuladoras B7/CD28 o CD40/CD40L. Esta disminución de la activación supondría que dichos LT no puedan proliferar y diferenciarse hacia LT efectores (ya sea LTh o LT citotóxicos).

Se cree que los LTh1 son una de las subpoblaciones que podrían contribuir más a la patología de la EM a través de la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL1, IFN- $\gamma$  o TNF. Estas citocinas favorecen la unión de los LT autorreactivos a las células endoteliales de la BHE colaborando en la secreción de metaloproteasas que contribuyen al daño de dicha BHE permitiendo el paso de LT activados hacia el SNC. Por el contrario, los LT que actúan frente a los LB infectados por el EBV serían los CD8+ citotóxicos.



De esta forma, el IFN- $\beta$  contribuiría a la modulación de la respuesta inmune propia de la EM (220).

En el estudio de M. Pender et al. (219) se halló una correlación inversa entre los títulos de IgG anti-EBNA-1 y la frecuencia de LT CD8+ específicos frente al EBV, en concreto la población de los LT CD8+ específicos de los antígenos líticos del EBV. Interpretaron dicho resultado como un control no efectivo por parte de estos LT CD8+ frente a las células infectadas por el EBV. Con motivo de esta falta de actuación de estos LT citotóxicos se incrementaría la población de LB infectados por el EBV y se elevaría por tanto la carga antigénica latente del EBNA-1, promoviendo los niveles más altos de IgG frente a este antígeno.

Por tanto, esta teoría podría explicar que el IFN- $\beta$ , al ser un tratamiento que disminuye la activación de los LT, incrementaría las IgG anti-EBNA-1 en aquellos pacientes en los que el fármaco es efectivo, considerado a nivel de disminución de brotes y/o disminución de la discapacidad.

Por el contrario, los niveles de IgG anti-VCA, no variaron significativamente con la respuesta al tratamiento. La explicación propuesta por el estudio comentado de M. Pender et al., podría justificar de nuevo nuestro resultado, puesto que tampoco en dicho estudio se halló correlación entre los niveles de IgG anti-VCA y la frecuencia de los LT. Su justificación se basa en que al no existir un buen control por parte de los LT CD8+ aumenta la carga antigénica lítica y por tanto también aumentarían los niveles de IgG VCA, pero al mismo tiempo también lo haría la propia proliferación de los LT CD8+ específicos líticos. Esta proliferación contrarrestaría en parte la carga antigénica lítica y por tanto no se observaría una relación inversa significativa con los niveles de IgG anti-VCA, al contrario de lo que ocurre con las inmunoglobulinas anti-EBNA-1.

Por otro lado, para cada uno de los tratamientos y antígenos del EBV estudiados se comprobó también si los valores previos al comienzo del tratamiento podían relacionarse con la posterior respuesta al mismo. En esta comparación no obtuvimos ninguna relación entre ambas variables concluyendo por tanto que los niveles de inmunoglobulinas y por tanto la respuesta al virus inicial de ese paciente es independiente de la efectividad posterior del fármaco utilizado.

**3. Estudio de los niveles de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA del EBV previos a cualquier tratamiento, con las variantes alélicas del HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1.**

Diversos trabajos han relacionado algunas variantes del MHC con un mayor riesgo de desarrollar EM o con variaciones en la severidad de la misma (221).

A su vez, otros estudios asociaron algunas de las moléculas del MHC más frecuentes en los pacientes con EM, con factores ambientales como el EBV.

Un ejemplo de esta interacción con el EBV se refleja en el estudio de Robert Zivadinov et al. (222). En su trabajo, hallaron una asociación entre el subtipo HLA-B7, relacionado con un incremento del riesgo de padecer la enfermedad, con la tendencia a valores más elevados de IgG anti-VCA. Asimismo, el subtipo HLA-A2, asociado por diferentes estudios a cierta protección frente a la EM, fue relacionado con valores más bajos de IgG anti-VCA.

En la línea del estudio anterior, E. Sundqvist et al. (215) asociaron los valores más bajos de IgG anti-EBNA-1 con la presencia del subtipo HLA-A2.

Por nuestra parte, recopilamos los datos genéticos referentes al HLA-I de los pacientes que habíamos estudiado serológicamente, pero disponíamos de pocos

individuos con estos datos, por lo que no pudimos analizar la asociación estadística entre ambas variables.

Además del HLA-I, también existen determinados subtipos del HLA-II asociados a un mayor riesgo de EM (65)(223)(224), por lo que puede que la combinación alélica que presentan estos pacientes influya en la diferente respuesta inmune frente al virus. Esto por tanto se reflejaría en niveles más o menos elevados de las IgG frente los antígenos estudiados.

La posible asociación de los niveles de estas inmunoglobulinas frente a ciertos subtipos del HLA-II puede deberse a las funciones inmunológicas de dicho complejo. El HLA-II interviene en la presentación de antígenos exógenos en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Estos antígenos son reconocidos por los LT CD4+, que favorecen la activación de LB que a su vez liberarán anticuerpos frente a esos antígenos. En el caso de la activación de LT autorreactivos frente a autoantígenos presentes en la mielina, podría contribuir al desencadenamiento del proceso patológico de la EM. (225)

Muchos autores están de acuerdo en que la gp42 del EBV interacciona con las moléculas del HLA-II. Según algunos estudios, esta interacción favorecería la infección del LB (226)(227). De acuerdo con otros trabajos, la glicoproteína 42 (gp42) se une al HLA-II perjudicando la activación mediante el TCR del LTh, por lo que dicho LT CD4+ no podría contribuir al control de la infección crónica frente al virus (228). En ambas hipótesis la respuesta inmunológica frente al virus sería diferente en función de la combinación alélica del HLA-II que tuviera el individuo.

Al disponer de suficientes datos genéticos sobre las moléculas del HLA-II de los pacientes de nuestro estudio, valoramos varios subtipos relacionados con la EM, como el HLA-DR, HLA-DQA1 y HLA-DQB1.

No hallamos ninguna asociación entre los valores de las IgG anti-EBNA-1 o anti-VCA y los subtipos más frecuentes del HLA-DR en estos pacientes, a diferencia de estudios como el de K. Strautins et al. (229). En este trabajo asociaban los niveles más altos de IgG anti-EBNA-1 con la presencia de los subtipos de mayor riesgo de la enfermedad DRB1\*08/\*15/\*16, mientras que los pacientes con subtipos de bajo riesgo como DRB1\*04/\*07/\*09 tenían valores más bajos. Por el contrario, al igual que nosotros, tampoco encontraban ninguna relación con los niveles de IgG anti-VCA.

En el análisis del subtipo HLA-DQA1, obtuvimos que la combinación alélica más frecuente en los pacientes de nuestro estudio era HLA-DQA1\*01:02/\*05:01, y que a su vez estaba asociada estadísticamente a valores más altos de los niveles de IgG anti-EBNA-1. Dicha asociación no se establecía para los niveles de IgG anti-VCA.

Asimismo, para la tercera combinación alélica más frecuente del HLA-DQA1 en estos pacientes, el HLA-DQA1\*05:01/\*05:01, obtuvimos una asociación con los valores más bajos de las IgG anti-EBNA-1. Al igual que en el caso anterior, tampoco hallamos relación entre ninguna de las combinaciones del HLA-DQA1 más frecuentes en estos pacientes y los niveles de IgG anti-VCA.

En lo referente al subtipo HLA-DQB1, obtuvimos que la combinación alélica más frecuente en los pacientes de nuestro estudio, el DQB1\*03:01/\*06:02, se asociaba estadísticamente a valores más elevados de los niveles de IgG anti-EBNA-1. Por el contrario y al igual que con el resto de subtipos del HLA estudiados, tampoco hallamos relación con los niveles de IgG anti-VCA.

Diversos estudios relacionan un haplotipo concreto, el DR15, con la respuesta al EBV en pacientes con EM (230) (231).

Este haplotipo está constituido por los subtipos DRB1\*15:01, DQA1\*01:02 y DQB1\*06:02 (232). En nuestro estudio, las combinaciones alélicas que se encontraron

en mayor frecuencia dentro de las moléculas HLA-DQA1 y HLA-DQB1 fueron DQA1\*0102/0501 y DQB1\*0301/0602, para las cuáles se halló una asociación con los niveles más altos de IgG anti-EBNA-1. Curiosamente ambas combinaciones incluyen el alelo DQA1\*0102 o el DQB1\*0602 pertenecientes al DR15, relacionado con el EBV como se mencionó anteriormente, y además ambos asociados a un mayor riesgo de EM (65)(224) . Asimismo, el alelo DQB1\*0301 también ha sido asociado a mayor severidad de la enfermedad en pacientes con esta enfermedad (233).

En contraposición con nuestros resultados, existen estudios como el de Qingxue Li et al. (234) en el que relacionaron, en un análisis realizado en individuos sanos, la seropositividad al EBV medido por IgG anti-VCA, con la presencia de diferentes alelos del HLA-DQB1. Obtuvieron una asociación entre la presencia de valores positivos de IgG anti-VCA y algunas combinaciones alélicas como el DQB1\*02/\*02. Mientras que otras combinaciones como el DQB1\*04/\*05 o el DQB1\*06/\*06 fueron asociadas a seronegatividad. Asimismo, hallaron una unión más débil de la gp42 del EBV a las moléculas de HLA-DQB1, de las combinaciones alélicas DQB1 \*04/\*05 y \*06/\*06. Por el contrario, la unión entre la gp42 y las moléculas del HLA de la combinación DQB1 \*02/\*02 resultó más fuerte.

En lo referente a la asociación que obtuvimos entre los valores más bajos de las IgG anti-EBNA-1 con la combinación alélica homocigota DQA1\*0501/\*0501, no hallamos en la bibliografía estudios que confirmasen o estuviesen en contra de dicho resultado.

Lo que aparece en la bibliografía son diversos estudios que no asocian el subtipo HLA-DQA1\*05 con la EM (235), incluso en alguno de ellos aparece con más frecuencia en controles que en pacientes (218). Descocemos el motivo por el que una de las combinaciones alélicas más frecuentes entre nuestros pacientes con EM, se asocia a

valores más bajos de IgG anti-EBNA-1 según nuestros resultados. Asimismo, desconocemos también porqué uno de los alelos del HLA-II más frecuentes en nuestros pacientes, es más prevalente en individuos control que en pacientes, según los estudios previamente mencionados. Una de las posibles explicaciones podría ser que este alelo tenga una frecuencia más alta en todos los individuos y por ello también en los pacientes con EM. Por tanto, según nuestros resultados serológicos podría tratarse de un alelo protector y por ello se observarían niveles más bajos de inmunoglobulinas frente al virus en dichos pacientes. Se necesitarían más estudios para poder confirmar este resultado o para entender el efecto de dicho alelo sobre la respuesta inmune frente al EBV.

Las diferentes asociaciones existentes en la bibliografía entre la serología frente al EBV y los distintos alelos del HLA-II, pueden deberse en parte a la diversidad en los estudios realizados. A pesar de estudiar las mismas inmunoglobulinas frente al EBV, las combinaciones alélicas del HLA-II analizadas en cada estudio son muy diversas. Algunos trabajos comparan alelos del HLA-DQ o DR de forma independiente, mientras que otros lo hacen con asociaciones de diferentes haplotipos.

Algunas investigaciones postulan, que pueden existir interacciones entre alelos de distintas moléculas del HLA-II (DQ, DR) o bien incluso con el HLA-I u otros genes. Dichas interacciones han sido propuestas por ciertos autores para explicar la influencia del MHC en el riesgo de EM (64). Por tanto, según esta hipótesis podríamos explicar la diversidad de resultados existentes en la bibliografía entre el HLA-II y la serología frente al EBV.

Un caso de especial interés dentro del subtipo HLA-DR, es el del alelo HLA-DRB1\*15:01. Este subtipo concreto del HLA-DR ha sido asociado en múltiples estudios realizados hasta la actualidad con un mayor riesgo de padecer la enfermedad

(236), así como con una mayor severidad de la misma (233) . Pero en ciertos estudios se considera que la asociación con la enfermedad no se debe al alelo HLA-DRB1\*15:01 en sí mismo, sino a otros alelos del haplotipo DR15, como el DQB1\*0602 o el DQA1\*0102. Según estudios como el de S.W. Serjeants et al. (237), el alelo el DQB1\*0602 podría asociarse a EM en ausencia del DRB1\*15:01.

La frecuencia del alelo DRB1\*15:01 varía en función de la población de pacientes con EM estudiada, estando según algunos estudios en torno al 39% de los pacientes con EM en Suecia (238), 18% en China , 39% en España (239) etc.

En nuestro estudio encontramos que el 37.8% de los pacientes con EM presentaban el alelo DRB1\*15:01.

Al analizar su posible correlación con la serología frente al EBV, no hallamos ninguna asociación con valores más o menos elevados de las IgG anti-EBNA-1 o anti-VCA.

Del mismo modo, otros autores como Nathali Kaushansky et al. (240), determinaron en sus estudios que el alelo DQB1\*0602 inducía susceptibilidad a la respuesta inmune frente a antígenos de la mielina como la PLP o la proteína básica de la mielina de los oligodendrocitos (MOBP). Por el contrario, el alelo DRB1\*15:01 no estaba asociado a dicha respuesta inmune.

Siguiendo la misma línea, en el estudio de A. Spurkland et al. (241), se concluyó que los alelos DQA1\*0102- DQB1\*0602 estaban relacionados con la EM en ausencia del alelo DRB1\*15:01.

Por tanto, a pesar de que tradicionalmente muchos trabajos han asociado el mayor riesgo a la enfermedad con el alelo DRB1\*15:01, podría ser debido tan solo al fenómeno del desequilibrio de ligamiento que existe entre los subtipos del HLA (242). De tal manera que como varios alelos forman parte de un haplotipo, sería difícil

distinguir cuáles son los que realmente están más relacionados con una patología. Esto podría explicar los valores más elevados de IgG anti-EBNA-1 en los pacientes de nuestro estudio portadores de los alelos DQA1\*0102 o DQB1\*0602, y la falta de asociación con el alelo DRB1\*15:01.

#### **4. Relación entre los niveles de anticuerpos IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA del EBV basales y los SNPs analizados.**

Además de los distintos alelos del MHC que puede presentar el paciente, muchos estudios han asociado la EM con determinados polimorfismos ajenos a los genes que codifican para el MHC. Según estudios GWAS se han relacionado múltiples polimorfismos con la enfermedad (69).

Recopilamos por tanto, la información genética disponible sobre 42 polimorfismos asociados a EM en la población de pacientes de nuestro estudio. Contrastamos esta información genética con los valores de inmunoglobulinas frente a los dos antígenos del EBV en los que centramos nuestro estudio serológico. Consideramos como genotipo WT el que incluía en homocigosis el alelo de mayor frecuencia, y como genotipo mutado el que incluía en homocigosis o heterocigosis el alelo de menor frecuencia poblacional.

El motivo de esta comparación se basaba en ver si la presencia del alelo considerado mutado en la población, podría influir en los niveles de inmunoglobulinas que presentase el paciente. De este modo, podríamos asociar la información genética, con un factor ambiental como es el EBV, y poder así estudiar la respuesta inmune al virus en estos pacientes.



De los 42 SNPs estudiados, encontramos una asociación entre los genotipos que presentaban el alelo considerado mutado en este estudio, con los niveles más elevados de IgG anti-EBNA-1, para los polimorfismos rs11129295 (p-valor= 0.013), rs12212193 (p=0.036) y rs17174870 (p=0.035).

Respecto a las IgG frente al VCA, los genotipos que contenían el alelo mutado del polimorfismo rs1738074 se asociaron a niveles más elevados de estas inmunoglobulinas (p= 0.023).

El polimorfismo rs11129295 se encuentra en el cromosoma 3 y está asociado a la expresión del factor de transcripción EOMES.

El factor EOMES contribuye a la maduración y desarrollo de células NK (243) y LT CD8+CD45Ro(244)(245).

De acuerdo con algunos estudios, la expresión de EOMES está disminuida en pacientes con EM (244). Del mismo modo, en los pacientes con EM la población de LT CD8+ está reducida, como comentamos previamente (218)(219). Esto se podría traducir en ese caso, en un peor control de la infección del EBV por parte del sistema inmune y por ello en estos pacientes se elevarían las inmunoglobulinas frente al virus.

No existen muchos trabajos en la bibliografía que comparen los niveles de inmunoglobulinas frente al EBV con los diversos genotipos del polimorfismo rs11129295. No obstante, estudios como el de Fiona C. McKay et al. (246) analizaron la posible correlación entre la expresión de factor EOMES basado en los niveles de ARN mensajero (ARNm) y los títulos de IgG anti-EBNA-1, pero no hallaron correlación.

A pesar de que en nuestro estudio obtuvimos una asociación con los valores más elevados de IgG anti-EBNA-1 en los genotipos CT y CC a diferencia del TT que consideramos WT, algunos estudios (247)(66) consideran que el alelo T está asociado a mayor riesgo de EM. En nuestro trabajo no analizamos este polimorfismo entre los

individuos control por lo que no podemos aportar resultados a favor o en contra de la hipótesis de que dicho alelo suponga mayor riesgo de presentar la enfermedad.

Por otra parte, el polimorfismo rs12212193 se encuentra en el cromosoma 6 y está relacionado con el gen que codifica para BACH2 “BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2”. BACH2 es un factor de transcripción que actúa a través de la proteína MAFK (248) y se expresa fundamentalmente en los LB (249). El mecanismo de acción de BACH2 no es del todo conocido pero se cree que tiene un efecto predominante anti-inflamatorio favoreciendo el desarrollo de los LT-reg y limitando la diferenciación hacia LT CD4+ efectores (144).

S. Perga et al. (250) en su estudio, hallaron una expresión de los niveles de BACH2 más reducida en pacientes con EM que en controles. Del mismo modo, obtuvieron una débil correlación negativa entre los niveles de BACH2 y el EDSS de los pacientes.

A pesar de que estos estudios podrían apoyar la idea de que los pacientes con EM presenten niveles más bajos de expresión de BACH2 y esto quizá podría suponer una respuesta inmune incontrolada o bien disminución de la destrucción del EBV y por tanto elevación de los niveles de IgG frente al virus, no hemos encontrado más estudios en la bibliografía que comparen las inmunoglobulinas frente al EBV con este SNP.

En nuestro estudio hallamos una asociación entre los genotipos que se presentaban el alelo G del polimorfismo rs12212193 con los valores más elevados de IgG anti-EBNA-1. Esto coincidiría con el alelo que algunos trabajos han asociado con mayor riesgo de EM (66). Por lo que siguiendo esta hipótesis, este alelo podría

predisponer a un peor control de la respuesta al virus e inducir mayor riesgo de presentar EM o mayor severidad de la misma.

Pero por el contrario hay estudios como el de T. Takakuwa et al. (251) que consideran que la reducción en la expresión del factor de transcripción BACH2 puede deberse a que el EBV se integra en el cromosoma 6 del genoma del LB que infecta, alterando el gen que codifica para BACH2.

Esta hipótesis no apoyaría el hecho de que el SNP rs12212193 predisponga genéticamente a la EM, severidad o progresión de la misma, pero ambas teorías podrían coexistir y contribuir conjuntamente a la patogenia de la enfermedad.

En lo referente al SNP rs17174870, se encuentra en el gen que codifica para el receptor tirosin-quinasa MERTK del cromosoma 2.

Se ha visto en estudios con ratones, que MERTK disminuye la activación de las células presentadoras de antígenos al favorecer la fagocitosis de las células apoptóticas por parte de ciertos macrófagos(252)(253). La falta de eliminación de las células apoptóticas puede conducir a autoinmunidad (254) . Por tanto si se reduce la expresión de MERTK podría suponer un fallo en la tolerancia de los LT.

Asimismo, más recientemente se ha hallado en el estudio de R. Cabezón et al. (255) que dicho receptor MERTK en humanos puede influir sobre la proliferación y activación de los LT y la producción de citoquinas, siendo un potente supresor de la respuesta inmune inducida por LT.

La relación entre el gen que codifica para MERTK y la EM ha sido propuesta en trabajos como el de Z. M. Ma. Gerry et al.(256) o en el de M. Binder et al. (257) entre otros. En éste último, el alelo minoritario T del SNP rs17174870, que no es considerado alelo de riesgo de EM por otros estudios (66) que consideran el alelo C, se asoció a una

menor expresión de MERTK. Este mismo alelo T forma parte de los dos genotipos TC y TT asociados por nuestro estudio a valores más elevados de IgG anti-EBNA-1 en pacientes con EM. Por ello, podemos pensar que este alelo podría influir en la falta de supresión de la respuesta inmune en estos pacientes.

En resumen, en estos 3 SNPs hallamos una asociación con valores más elevados de IgG anti-EBNA-1. Dado que previamente habíamos asociado los valores más elevados de estas inmunoglobulinas con una mayor progresión de la enfermedad, al menos en pacientes tratados con natalizumab, podríamos pensar que las mutaciones mencionadas podrían predisponer a un empeoramiento del curso de la enfermedad.

Por último, el polimorfismo rs1738074 se encuentra en el gen TAGAP presente en cromosoma 6 que codifica para una proteína Rho- GTPasa-activadora. TAGAP tiene un patrón de expresión similar al de la IL-2 e interviene en la activación de los LT (258) (155).

D. Akkad et al. (259) hallaron una correlación entre la presencia del alelo G, considerado de riesgo en la EM por algunos estudios (66), y la mayor discapacidad de los pacientes que lo presentaban. Otros trabajos como el de Ali Jazaeri et al. (260) asociaron el mismo alelo a un mayor riesgo de EM.

Pero por el contrario, en nuestro estudio fueron los genotipos que contenían el alelo A (AA y AG) los que se asociaron a niveles más elevados de IgG anti-VCA.

No se conoce mucho acerca del mecanismo de acción de la proteína codificada por el gen TAGAP, tan sólo la bibliografía menciona que ayuda a la activación de los LT como se ha comentado anteriormente, y en concreto N.Tamehiro et al. (261) proponen que favorece la activación de los LTh17. Quizá conociendo mejor su mecanismo de acción se podría entender nuestro resultado, pero igualmente se

necesitarían más estudios que comparasen el polimorfismo rs1738074 con la serología frente al EBV, o bien la expresión de TAGAP en pacientes y controles, para poder confirmarlo.

A pesar de los resultados obtenidos en el análisis global de los SNPs, sería conveniente para poder confirmar estas teorías, tratar de validar estos resultados en otras cohortes independientes y con un mayor número de pacientes para obtener resultados más robustos.

## **5. Estudio de los individuos control.**

### **5.1 Estudio de la posible asociación de los niveles de anticuerpos IgG frente a los antígenos EBNA-1 y VCA del EBV con los factores: sexo, edad y la variante alélica DRB1\*15:01 asociado a EM.**

Para comparar los resultados obtenidos en los pacientes con EM con el resto de la población, analizamos algunos de los datos fundamentales del estudio en una muestra de individuos sanos sin la patología y sin antecedentes familiares de la misma.

Para ello, determinamos los valores serológicos de las IgG anti-EBNA-1 y anti-VCA en estos individuos control, por la misma técnica ELISA empleada en los pacientes.

Con los datos obtenidos, estudiamos la posible asociación con el sexo de los individuos de la muestra control. No se obtuvo ninguna asociación entre los niveles de IgG frente a EBNA-1 o VCA y el sexo. Este resultado concuerda con el obtenido en el estudio de Tarek H. Mouhieddine et al. (202), en el que tampoco se halló ninguna asociación entre el sexo de los individuos control y los valores de IgG contra el EBV.

Por tanto con estos resultados, al igual que en los pacientes, no parece que el sexo del individuo pueda influir en la distinta respuesta al virus.

En lo referente a la edad de los individuos control, tampoco hallamos ninguna correlación con los resultados serológicos frente al EBV.

Pero en este caso la bibliografía difiere entre estudios que apoyan la falta de correlación entre edad y respuesta serológica al EBV como por ejemplo el de K. L. Munger et al.(199), con otros trabajos en los que afirman encontrar una asociación entre ambas variables. Ejemplos de esta asociación son, el estudio de Tarek H. Mouhieddine et al. (202) en el que se obtuvo una correlación positiva entre los valores de IgG anti-VCA y la edad tan solo en individuos control, o el de M. Auer et al. (262) que obtuvo la misma correlación pero con los niveles de IgG anti-EBNA-1.

A pesar de haber discrepancias en la literatura en este contraste de variables, nosotros no asociamos los resultados serológicos frente al EBV con la edad en los individuos control, al igual que tampoco lo habíamos asociado en los pacientes con EM estudiados.

De tal modo que si consideramos nuestros resultados tanto de pacientes como de controles, la respuesta al EBV no estaría condicionada por las variables edad o sexo del individuo.

Dado que según estudios previamente publicados, se considera que el subtipo de HLA-II DRB1\*15:01 es uno de los más asociados a EM, recopilamos la información genética referente a este alelo concreto de los individuos control estudiados.

En esta muestra control hallamos el subtipo mencionado en el 16,3% de los individuos estudiados, a diferencia de la presencia en el 37,8% de los pacientes con EM de nuestro estudio.

Al contrastar la serología frente al virus en los individuos control con este subtipo, hallamos una asociación entre la presencia del DRB1\*15:01 y los niveles más elevados de IgG anti-EBNA-1.

Por el contrario los niveles de IgG anti-VCA no se asociaron a la presencia del subtipo estudiado.

Existen muchos estudios en la bibliografía que asocian el DRB1\*15:01 con niveles más elevados de los anticuerpos frente al EBV. Un ejemplo de ello son estudios como el de Kishore Malyavantham et al.(263) o el de E Sundqvist et al.(215).

Por el contrario, en varios estudios (264) (265) no se estableció una asociación entre los niveles elevados de IgG anti EBNA-1 y la presencia del subtipo DRB1\*15:01 en individuos control, a diferencia de los pacientes con EM en los que sí se asoció.

Nuestros resultados conjuntos de pacientes y controles reflejan lo contrario, una falta de asociación entre la presencia del subtipo DRB1\*15:01 y la serología frente al EBV en pacientes, pero una asociación en individuos control.

La explicación a este resultado contrapuesto podría ser debido al papel de los subtipos genéticos DQA1\*0102 o DQB1\*0602 que están en desequilibrio de ligamiento con el DRB1\*15:01. De esta forma, la influencia de cada subtipo por separado puede verse afectada por los demás. En el caso de los individuos control no pudimos realizar el contraste entre la serología frente al EBV y los subtipos DQA1\*0102 o DQB1\*0602, puesto que carecíamos de esta información genética. Sería conveniente en nuevos estudios ampliar esta información para poder contar con más datos y entender mejor estos resultados.

## **5.2. Comparación entre individuos control y pacientes con EM.**

Para valorar las diferencias en los niveles de las inmunoglobulinas frente a los antígenos del EBV entre los individuos control y los pacientes estudiados, se consideró el valor de la mediana obtenido para los individuos control. Tras el estudio estadístico, se obtuvo una asociación de los valores por debajo de la mediana tanto de las IgG anti-EBNA-1 como anti-VCA en los individuos control, mientras que los pacientes con EM tenían niveles superiores a la mediana para ambos tipos de anticuerpos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en muchos estudios. En alguno de ellos, como el de Gerald N. DeLorenze et al.(266), se obtuvieron valores más elevados estadísticamente significativos en pacientes que en controles para las IgG anti-EBNA-1 pero no para las IgG anti-VCA. A diferencia de nuestro trabajo, en este estudio se empleó una técnica diferente como es la inmunofluorescencia indirecta. Los mismos resultados que en el estudio de Gerald N. DeLorenze et al, fueron obtenidos en el de R.A. Farrell et al. (210), con la diferencia de que sus determinaciones fueron realizadas con un ensayo de quimioluminiscencia.

En otros trabajos (54)(267)(268) se estudiaron tan sólo los anticuerpos frente al EBNA-1 mediante la técnica ELISA, obteniendo también valores más elevados en pacientes que en controles.

Por el contrario, muchos otros estudios que han analizado las IgG frente a ambos antígenos, han hallado al igual que nosotros niveles más elevados de ambos anticuerpos en pacientes con la enfermedad que en individuos control. Ejemplos de estos resultados son estudios como el de K. L. Munger et al. (199) basado en la inmunofluorescencia, o bien trabajos como los de D. Pohl, MD et al. (269) o el de Hisham S. Abdelrahman et al. (270) realizados, al igual que nosotros, mediante la técnica ELISA.



De los resultados obtenidos en la mayoría de trabajos de la literatura, al igual que de nuestra propia comparación entre individuos control y pacientes con EM, se podría concluir que las IgG están más elevadas en los pacientes con la enfermedad, fundamentalmente frente al antígeno EBNA-1 aunque también frente al VCA en la mayoría de las ocasiones. Con ello surge la pregunta del motivo por el que esto sucede.

Teniendo en cuenta que existen varias teorías al respecto, como la del mecanismo de la activación inespecífica (*bystander activation*) (39)(41) o la del mimetismo molecular (42)(44), en individuos que estén predispuestos genéticamente a través de los distintos subtipos alélicos del HLA o SNPs mencionados previamente, podría desencadenar una elevación de los niveles de las inmunoglobulinas estudiadas. Esta elevación por tanto, podría estar relacionada con los daños que ocurren a nivel de la mielina en el SNC en los pacientes con EM.



## **CONCLUSIONES**



## **CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Los pacientes con EM presentaron unos niveles tanto de IgG anti-EBNA-1 como anti-VCA estadísticamente superiores con respecto a los individuos considerados control.
2. Los valores de las IgG estudiadas previos al inicio de los tres tratamientos considerados, no influyeron en la posterior respuesta del paciente al tratamiento.
3. Los parámetros demográficos sexo y edad, así como los parámetros clínicos duración de la enfermedad y MSSS, no parecen asociarse con las variaciones de los niveles de IgG anti-EBNA-1 ni anti-VCA que presentaron los pacientes con EM a lo largo de los dos años de seguimiento.
4. Nuestros datos apoyan que los brotes ocurridos durante los dos años de tratamiento, no se correlacionan con variación alguna de los niveles de las IgG anti-EBNA-1 ni anti-VCA al finalizar dicho periodo.
5. Los pacientes en tratamiento con natalizumab en los que progresa la enfermedad, presentan valores más elevados de los niveles de IgG anti-EBNA-1 tras los dos años de tratamiento, con respecto a los que no progresa. Por el contrario,

los niveles de las IgG anti-EBNA-1 no varían en función de la progresión en los pacientes tratados con AG o IFN- $\beta$ .

6. No existe ninguna asociación entre la progresión o la respuesta al tratamiento y los niveles de IgG anti-VCA para ninguno de los tres tratamientos estudiados.

7. Las combinaciones alélicas HLA-DQA1\*01:02/\*05:01 y DQB1\*03:01/\*06:02 se asociaron estadísticamente a valores más elevados de los niveles de IgG anti-EBNA-1, mientras que la combinación HLA-DQA1\*05:01/\*05:01 se asoció a valores más bajos de las IgG anti-EBNA-1.

8. La presencia del HLA DRB1\*15:01 no se asoció con valores más o menos elevados de las IgG anti-EBNA-1 o anti-VCA en los pacientes con EM.

9. Los SNPs rs11129295, rs12212193 y rs17174870 se asociaron estadísticamente con niveles más elevados de IgG anti-EBNA-1, mientras que el SNP rs1738074 fue asociado a niveles más elevados de IgG anti-VCA.

## **BIBLIOGRAFÍA**





## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Prineas J. Pathology of multiple sclerosis. In: Cook S, editor. Handbook of multiple sclerosis. Third. Marcel Dekker; 2001. p. 289–324.
2. Goldenberg MM. Multiple Sclerosis Review. P&T. 2012;37(3):175–84.
3. Bjartmar C, Trapp BD. Axonal Injury and Disease Progression in Multiple Sclerosis. In: Burt RK, Marmont AM, editors. Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease. Georgetown: Landes Bioscience; 2004. p. 284–9.
4. MSIF. Atlas of MS 2013: Mapping multiple sclerosis around the world. 2013.
5. Chitnis T, Glanz B, Jaffin S, Healy B. Demographics of pediatric-onset multiple sclerosis in an MS center population from the Northeastern United States. *Mult Scler*. 2009;15:627–31.
6. Neuteboom RF. Pregnancy and multiple sclerosis. Childhood onset MS and MS during Pregnancy. Erasmus University Rotterdam; 2012.
7. Sellner J, Kraus J, Awad A, Milo R, Hemmer B, Stüve O. The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis-A critical analysis of potential environmental factors. *Autoimmun Rev*. 2011;10:495–502.
8. Alvaro Alonso M, Miguel A. Hernán M. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2008;71:129–35.
9. Correale J, Farez M. Helminth Antigens Modulate Immune Responses in Cells from Multiple Sclerosis Patients through TLR2-Dependent Mechanisms. *J Immunol*. 2009;183:5999–6012.
10. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol*. 2006;13(7):700–22.
11. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010;9(5):520–32.
12. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82:1132–41.
13. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain*. 2000;123:968–74.
14. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*. 2010;9:A387–94.
15. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand*. 1975;51:110–36.
16. Ingrid A.F. van der Mei, Anne-Louise Ponsonby, Leigh Blizzard TD. Regional Variation in Multiple Sclerosis. Prevalence in Australia and Its Association with Ambient Ultraviolet Radiation. *Neuroepidemiology*. 2001;20:168–74.

17. Van der Mei I a F, Ponsonby A-L, Dwyer T, Blizzard L, Simmons R, Taylor B V, et al. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ*. 2003;327:1–6.
18. Hart PH, Gorman S, Finlay-Jones JJ. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):584–96.
19. Bogh MKB, Schmedes A V, Philipsen P a, Thieden E, Wulf HC. Vitamin D production after UVB exposure depends on baseline vitamin D and total cholesterol but not on skin pigmentation. *J Invest Dermatol*. 2010;130:546–53.
20. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol*. 2008;194:7–17.
21. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*. 2006;296(23):2832–8.
22. Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, Laitinen I, Eralinna J-P, Lilius E-M, Mononen I. A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:152–7.
23. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol*. 2012;280(1):22–35.
24. Holmøy T. Vitamin D status modulates the immune response to Epstein Barr virus: Synergistic effect of risk factors in multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 2008;70(1):66–9.
25. Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology*. 2003;61:1122–4.
26. Hernán M a., Olek MJ, Ascherio A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol*. 2001;154(1):69–74.
27. Sundström P, Nyström L. Smoking worsens the prognosis in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008;14:1031–5.
28. Rosete PG, Ledesma RL, Mancilla BE, Galindo EZ. Óxido Nítrico: Una Molécula Multifuncional. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 1999;12(4):300–4.
29. Mitrovic B, Parkinson J, Merrill JE. An in Vitro Model of Oligodendrocyte Destruction by Nitric Oxide and Its Relevance to Multiple Sclerosis. *Methods*. 1996;10(3):501–13.
30. Ghasemi M, Fatemi A. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;45:168–82.
31. Jafari N, Hintzen RQ. The association between cigarette smoking and multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2011;311(1–2):78–85.
32. Rejdak K, Eikelenboom MJ, Petzold A, Thompson EJ, Stelmasiak Z, Lazeron RHC, et al. CSF nitric oxide metabolites are associated with activity and progression of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;63:1439–45.

33. Leung G, Sun W, Zheng L, Brookes S, Tully M, Shi R. Anti-acrolein treatment improves behavioral outcome and alleviates myelin damage in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse. *Neuroscience*. 2011;173:150–5.
34. Simon KC, Mei IAF Van Der, Munger KL, Sundstro P. Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1\*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology*. 2010;74:1365–71.
35. Munger KL, Chitnis T, Ascherio A. Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology*. 2009;73(19):1543–50.
36. Landtblom a M, Flodin U, Söderfeldt B, Wolfson C, Axelson O. Organic solvents and multiple sclerosis: a synthesis of the current evidence. *Epidemiology*. 1996;7(4):429–33.
37. Goodin DS, Ebers GC, Johnson KP, Rodriguez M, Sibley W a, Wolinsky JS. The relationship of MS to physical trauma and psychological stress. *Aan*. 1999;52(9):1737–45.
38. Álvarez-Lafuente R. Evidencias existentes acerca de la posible implicación de los virus en la esclerosis múltiple. *Rev española Escler múltiple*. 2013;26:15–27.
39. Scarisbrick I a, Rodriguez M. Hit-Hit and hit-Run: viruses in the playing field of multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2003;3(3):265–71.
40. Kakalacheva K, Münz C, Lünemann JD. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):132–40.
41. Haring JS, Pewe LL, Perlman S. Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system. *J Immunol*. 2002;169(3):1550–5.
42. Kokuina E. De la autoinmunidad a las enfermedades autoinmunes. *Rev Cubana Med*. 2001;40(1):36–44.
43. Fujinami RS, Herrath MG Von, Christen U, Whitton JL. Molecular Mimicry , Bystander Activation , or Viral Persistence : Infections and Autoimmune Disease Molecular Mimicry , Bystander Activation , or Viral Persistence : Infections and Autoimmune Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(1):80–94.
44. Cheng W, Ma Y, Gong F, Hu C, Qian L, Huang Q, et al. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front Biosci*. 2012;17:1648–58.
45. Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, Cooper NR. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol*. 1987;61(5):1416–20.
46. Wang X, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J Virol*. 1998;72(1):158–63.
47. Gilden DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2005;4(3):195–202.
48. De Paschale M, Clerici P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol*. 2012;1(1):31–43.

49. Thorley-Lawson D a. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):75–82.
50. Maghzi A-H, Marta M, Bosca I, Etemadifar M, Dobson R, Maggiore C, et al. Viral pathophysiology of multiple sclerosis: A role for Epstein-Barr virus infection? *Pathophysiology.* 2011;18(1):13–20.
51. Cohen JI. Virology and Molecular Biology of Epstein–Barr Virus. In: Tselis A, Jenson HB, editors. *Epstein-Barr Virus.* New York: Taylor & Francis Group; 2006. p. 21–37.
52. Jenson HB. Epstein-Barr Virus. *Pediatr Rev.* 2011;32:375–84.
53. De Paschale M, Agrappi C, Manco MT, Mirri P, Vigano EF, Clerici P. Seroepidemiology of EBV and Interpretation of the ““Isolated VCA IgG”” Pattern. *J Med Virol.* 2009;81(2):325–31.
54. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büsow K, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1352–60.
55. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán M a, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Jama.* 2001;286(24):3083–8.
56. Tzartos JS, Khan G, Vossenkamper A, Cruz-Sadaba M, Lonardi S, Sefia E, et al. Association of innate immune activation with latent epstein-barr virus in active MS lesions. *Neurology.* 2012;78(1):15–23.
57. Sargsyan S a., Shearer a. J, Ritchie a. M, Burgoon MP, Anderson S, Hemmer B, et al. Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74(14):1127–35.
58. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. 2007;204(12):2899–912.
59. Rubicz R, Yolken R, Drigalenko E, Carless M a, Dyer TD, Bauman L, et al. A genome-wide integrative genomic study localizes genetic factors influencing antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1). *PLoS Genet.* 2013;9(1):1–17.
60. Wandinger K-P, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H-J, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology.* 2000;55(2):178–84.
61. Sadovnick a. ., Dymment D., Ebers G., Risch N. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. *Lancet.* 1996;347(9017):1728–30.
62. Carton H, Vlietinck R, Debruyne J, De Keyser J, D’Hooghe MB, Loos R, et al. Risks of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;62(4):329–33.
63. Westerlind H, Ramanujam R, Uvehag D, Kuja-Halkola R, Boman M, Bottai M, et al. Modest familial risks for multiple sclerosis: A registry-based study of the population of Sweden. *Brain.* 2014;137(3):770–8.
64. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymment D a, Tiislar M, et al. A

- predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2005;37(10):1108–12.
65. Spurkland A, Skjold Ronningen K, Vandvik B, Thorsby E, Vartdal F. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes may jointly determine susceptibility to develop multiple sclerosis. *Hum Immunol.* 1991;30(1):69–75.
66. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC a, Patsopoulos N a, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2012;476(7359):214–9.
67. McDonnell G V., Mawhinney H, Graham C a., Hawkins S a., Middleton D. A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple-sclerosis and its influence on prognosis. *J Neurol Sci.* 1999;165(1):77–83.
68. Fogdell-Hahn a, Ligers A, Gronning M, Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens.* 2000;55(2):140–8.
69. International multiple sclerosis genetics consortium (IMSGC), Beecham A, Patsopoulos N, Xifara D, Davis M, Kempainen A, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013;45(11):1353–60.
70. The international multiple sclerosis genetics Consortium. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *N Engl J Med.* 2007;357(9):851–62.
71. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Claire Simon K, McCullough ML, Gallicchio L, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet.* 2010;19(13):2739–45.
72. Dymant D a., Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick a. D, et al. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: Susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet.* 2005;14(14):2019–26.
73. Ramagopalan S V., Morris AP, Dymant D a., Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet.* 2007;3(9):1607–13.
74. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23 / IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1218–22.
75. Greer JM, Pender MP. Myelin proteolipid protein: An effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *J Autoimmun.* 2008;31(3):281–7.
76. Koehler NKU, Genain CP, Giesser B, Hauser SL. The Human T Cell Response to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: A Multiple Sclerosis Family-Based Study. *J Immunol.* 2002;168(11):5920–7.
77. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2000;6(1):67–70.
78. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res.* 2005;81(3):374–89.
79. Weber MS, Hemmer Bernhard B, Cepok S. The role of antibodies in multiple

- sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):239–45.
80. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology*. 1996;46(4):907–11.
81. Vukusic S, Confavreux C. Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol*. 2007;20(3):269–74.
82. Carretero Ares JL, Bowakim Dib W, Acebes Rey JM. Actualización: esclerosis múltiple. *Medifam*. 2001;11(9):516–29.
83. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292–302.
84. Crayton HJ, Rossman HS. Managing the symptoms of multiple sclerosis: a multimodal approach. *Clin Ther*. 2006;28(4):445–60.
85. Sellebjerg F, Barnes D, Filippini G, Midgard R, Montalban X, Rieckmann P, et al. EFNS guideline on treatment of multiple sclerosis relapses : report of an EFNS task force on treatment of multiple sclerosis relapses. *Eur J Neurol*. 2005;12(12):939–46.
86. Gajofatto A, Benedetti MD. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? *World J Clin Cases*. 2015;3(7):545–56.
87. Río J, Comabella M, Montalban X. Multiple sclerosis: current treatment algorithms. *Curr Opin Neurol*. 2011;24(3):230–7.
88. Río J, Tintoré M, Sastre-Garriga J, Nos C, Castelló J, Tur C, et al. Change in the clinical activity of multiple sclerosis after treatment switch for suboptimal response. *Eur J Neurol*. 2012;19(6):899–904.
89. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology*. 1998;51(3):682–9.
90. Madsen C. The innovative development in interferon beta treatments of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain Behav*. 2017;7(6):1–8.
91. Jacobs L, Cookfair D, Rudick R, Herndon R, Richert J, Salazar A, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1996;39(3):285–94.
92. Goodkin D. Interferon beta-1b. *Lancet*. 1994;344(8929):1057–60.
93. Ebers GC, Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis Study group. Randomised double-blind placebo-controlled study of Interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet*. 1998;352(9139):1498–504.
94. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Moses Rodriguez, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *Nw Engl J Med*. 2000;343(13):938–52.
95. Farina C, Weber MS, Meinl E, Wekerle H, Holfeld R. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol*. 2005;4:567–75.
96. Wiendl H, Toyka K V, Rieckmann P, Gold R, Hartung H-P, Hohlfeld R. Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current

- therapeutic recommendations. *J Neurol*. 2008;255(10):1449–63.
97. Selewski DT, Shah G V., Segal BM, Rajdev PA, Mukherji SK. Natalizumab (Tysabri). *Am J Neuroradiol*. 2010;31(9):1588–90.
  98. Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(6):510–8.
  99. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):2239–46.
  100. Fernández AM, Fernández V, Guerrero M, Fernández O. El virus JC y la leucoencefalopatía multifocal progresiva : implicaciones en el tratamiento actual de la esclerosis múltiple. *Rev española Escler múltiple*. 2010;16:34–42.
  101. McGuigan C, Craner M, Guadagno J, Kapoor R, Mazibrada G, Molyneux P, et al. Stratification and monitoring of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy risk: Recommendations from an expert group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(2):117–25.
  102. Sharma S, Mathur a G, Pradhan S, Singh DB, Gupta S. Fingolimod (FTY720): First approved oral therapy for multiple sclerosis. *J Pharmacol Pharmacother*. 2011;2(1):49–51.
  103. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, et al. The Immune Modulator FTY720 Targets Sphingosine 1-Phosphate Receptors. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21453–7.
  104. Cruz VT, Fonseca J. Efectos del Fingolimod en el Sistema Nervioso Central. *Rev Neurol*. 2014;59(3):121–8.
  105. Ingwersen J, Aktas O, Kuery P, Kieseier B, Boyko A, Hartung HP. Fingolimod in multiple sclerosis: Mechanisms of action and clinical efficacy. *Clin Immunol*. 2012;142(1):15–24.
  106. Minagar A, Alexander JS, Sahraian MA, Zivadinov R. Alemtuzumab and multiple sclerosis: therapeutic application. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(3):421–9.
  107. Teriflunomide (Aubagio) Multiple sclerosis: just a metabolite of leflunomide. *Prescrire Int*. 2015;24(158):61–4.
  108. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, Kaplan J, Wiendl H. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs*. 2014;74(6):659–74.
  109. Fox EJ. Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology*. 2004;63(12 Suppl 6):S15–8.
  110. Le Page E, Leray E, Taurin G, Coustans M, Chaperon J, Morrissey SP, et al. Mitoxantrone as induction treatment in aggressive relapsing remitting multiple sclerosis: treatment response factors in a 5 year follow-up observational study of 100 consecutive patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(1):52–6.
  111. Gajofatto A. Spotlight on siponimod and its potential in the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: the evidence to date. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:3153–7.

112. Gingele S, Jacobus T, Konen F, Hümmert M, Sühs K-W, Schwenkenbecher P, et al. Ocrelizumab Depletes CD20+ T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Cells*. 2018;8(1):1–6.
113. Myhr KM, Torkildsen Ø, Lossius A, Bø L, Holmøy T. B cell depletion in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2019;19(3):261–71.
114. Sorensen PS, Blinkenberg M. The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord*. 2016;9(1):44–52.
115. Jacobs BM, Ammoscato F, Giovannoni G, Baker D, Schmierer K. Cladribine: Mechanisms and mysteries in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;1266–71.
116. Bielekova B. Daclizumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2013;10(1):55–67.
117. Kappos L, Wiendl H, Selmaj K, Arnold DL, Havrdova E, Boyko A, et al. Daclizumab HYP versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1418–28.
118. Venci J V., Gandhi MA. Dimethyl Fumarate (Tecfidera): A New Oral Agent for Multiple Sclerosis. *Ann Pharmacother*. 2013;47(12):1697–702.
119. Calabresi P, Gionnvanoni G, Confavreux C, Galetta S, Havrdova E, Hutchinson M, et al. The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology*. 2007;69(14):1391–403.
120. Sørensen PS, Hyldgaard Jensen PE, Haghikia A, Lundkvist M, Vedeler C, Sellebjerg F, et al. Occurrence of antibodies against natalizumab in relapsing multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Mult Scler*. 2011;17(9):1074–8.
121. Oliver-Martos B, Órpez-Zafra T, Urbaneja P, Maldonado-Sanchez R, Leyva L, Fernández O. Early development of anti-natalizumab antibodies in MS patients. *J Neurol*. 2013;260(9):2343–7.
122. Creeke PI, Farrell R a. Clinical testing for neutralizing antibodies to interferon- $\beta$  in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013;6(1):3–17.
123. Sørensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr K-M, Palace J, et al. Guidelines on use of anti-IFN-beta antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-beta antibodies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2005;12(11):817–27.
124. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K, et al. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet*. 2003;362(9391):1184–91.
125. Per Soelberg Sørensen M, Nils Koch-Henriksen M, Poul Erik Hyldgaard Jensen M. Neutralizing antibodies against interferon- $\beta$  do not predispose antibodies against natalizumab. *Neurology*. 2011;76(8):759–60.
126. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the



- International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121–7.
127. Tur C, Montalban X. CSF oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald Criteria 2010: No. *Mult Scler*. 2013;19(6):717–8.
128. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–52.
129. Izquierdo G, Peña JLR. Evaluación clínica de la esclerosis múltiple : cuantificación mediante la utilización de escalas. 2003;36(2):145–52.
130. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple Sclerosis Severity Score disease severity. *Neurology*. 2005;64(7):1144–51.
131. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnosis criteria for Multiple Sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983;13(3):227–31.
132. Río J, Nos C, Tintoré M, Téllez N, Galán I, Pelayo R, et al. Defining the response to interferon- $\beta$  in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006;59(2):344–52.
133. Fusco C, Andreone V, Coppola G, Luongo V, Guerini F, Pace E, et al. HLA-DRB1 \* 1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 2001;57(11):1976–9.
134. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2012;476(7359):214–9.
135. Bloch DB, De la Monte SM, Guigaouri P, Filippov A, Bloch KD. Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body. *J Biol Chem*. 1996;271(46):29198–204.
136. Ryan EJ, Marshall AJ, Magaletti D, Floyd H, Draves KE, Olson NE, et al. Dendritic Cell-Associated Lectin-1: A Novel Dendritic Cell-Associated, C-Type Lectin-Like Molecule Enhances T Cell Secretion of IL-4. *J Immunol*. 2002;169(10):5638–48.
137. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, et al. Control of Effector CD8<sup>+</sup> T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science*. 2003;302(5647):1041–3.
138. Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, et al. Anomalous Type 17 Response to Viral Infection by CD8<sup>+</sup> T Cells Lacking T-bet and Eomesodermin. *Science*. 2010;321(5887):408–11.
139. Lefebvre C, Rajbhandari P, Alvarez MJ, Bandaru P, Lim WK, Sato M, et al. A human B-cell interactome identifies MYB and FOXM1 as master regulators of proliferation in germinal centers. *Mol Syst Biol*. 2010;6(377):1–10.
140. Nakata Y, Brignier AC, Jin S, Shen Y, Rudnick SI, Sugita M, et al. c-Myb, Menin, GATA-3, and MLL form a dynamic transcription complex that plays a pivotal role in human T helper type 2 cell development. *Blood*.

- 2010;116(8):1280–90.
141. Eldridge AG, Loktev A V., Hansen D V., Verschuren EW, Reimann JDR, Jackson PK. The Evi5 oncogene regulates cyclin accumulation by stabilizing the anaphase-promoting complex inhibitor Emi1. *Cell*. 2006;124(2):367–80.
142. Muto A, Tashiro S, Nakajima O, Hoshino H, Takahashi S, Sakoda E, et al. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature*. 2004;429(6991):566–71.
143. Watanabe-matsui M, Muto A, Matsui T, Itoh-nakadai A, Nakajima O, Muruyama K, et al. Heme regulates B cell differentiation , antibody class switch , and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2. *Blood*. 2011;117(20):5438–49.
144. Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, Clever D, Dema B, Yu Z, et al. Bach2 represses effector programmes to stabilize Treg -mediated immune homeostasis. *Nature*. 2013;498(7455):506–10.
145. Barizzzone N, Pauwels I, Luciano B, Franckaert D, Guerini FR, Cosemans L, et al. No evidence for a role of rare CYP27B1 functional variations in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2013;73(3):433–7.
146. Sharma M, Li X, Wang Y, Zarnegar M, Huang CY, Palvimo JJ, et al. hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *EMBO J*. 2003;22(22):6101–14.
147. Weisz A, Marx P, Sharf R, Appella E, Driggers PH, Ozato K, et al. Human interferon consensus sequence binding protein is a negative regulator of enhancer elements common to interferon-inducible genes. *J Biol Chem*. 1992;267(35):25589–96.
148. Tamura T, Ozato K. ICSBP/IRF-8: its regulatory roles in the development of myeloid cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22(1):145–52.
149. Wyss DF, Choi JS, Li J, Knoppers MH, Willis KJ, Arulanandam AR, et al. Conformation and function of the N-linked glycan in the adhesion domain of human CD2. *Science*. 1995;269(5228):1273–8.
150. Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, et al. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet*. 1999;23(3):333–7.
151. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, et al. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(1):302–6.
152. Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, Kindsvogel W, Jaspers S, Chen Z, et al. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9511–6.
153. Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol*. 2001;166(12):7090–5.
154. Binder MD, Kilpatrick TJ. TAM receptor signalling and demyelination. *NeuroSignals*. 2009;17(4):277–87.

155. Mao M, Biery MC, Kobayashi S V., Ward T, Schimmack G, Burchard J, et al. T lymphocyte activation gene identification by coregulated expression on DNA microarrays. *Genomics*. 2004;83(6):989–99.
156. Graham M, Adams JM. Chromosome 8 breakpoint far 3' of the c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma 2;8 variant translocation is equivalent to the murine pvt-1 locus. *EMBO J*. 1986;5(11):2845–51.
157. Carramusa L, Contino F, Ferro A, Minafra L, Perconti G, Giallongo A, et al. The PVT-1 Oncogene Is a Myc Protein Target That Is Overexpressed in Transformed Cells. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):511–8.
158. Luzi P, Rafi MA, Wenger DA. Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) Gene. *Genomics*. 1995;26(2):407–9.
159. Drulovic J, Cupic M, Mostarica-Stojkovic M, Pravica V, Savic E, Markovic M, et al. Multiple sclerosis: individualized disease susceptibility and therapy response. *Biomark Med*. 2013;7(1):59–71.
160. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Genes Immun*. 2010;11(5):397–405.
161. Chen KS, Prah JM, DeLuca HF. Isolation and expression of human 1,25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90(10):4543–7.
162. Fischer AM, Katayama CD, Pagès G, Pouyssegur J, Hedrick SM. The role of Erk1 and Erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity*. 2005;23(4):431–43.
163. Restrepo NA, Butkiewicz M, McGrath JA, Crawford DC. Shared Genetic Etiology of Autoimmune Diseases in Patients from a Biorepository Linked to De-identified Electronic Health Records. *Front Genet*. 2016;7:1–10.
164. Wu H, Wang W, Xu H. Depletion of C3orf1/TIMMDC1 inhibits migration and proliferation in 95D lung carcinoma cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):20555–71.
165. Betz BC, Jordan-Williams KL, Wang C, Kang SG, Liao J, Logan MR, et al. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J Exp Med*. 2010;207(5):933–42.
166. Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee W, Smith WA, Solomon B, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls TH 17 differentiation. *Nature*. 2009;460(7253):405–9.
167. Tussiwand R, Lee W, Murphy TL, Mashayekhi M, Albring JC, Satpathy AT, et al. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF- IRF interactions. *Nature*. 2012;490(7421):502–7.
168. Kuroda S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Takayanagi H, Iwai Y. Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation via Sirt1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(36):14885–9.
169. Ise W, Kohyama M, Schraml BU, Zhang T, Basu U, Alt FW, et al. BATF controls the global regulators of CSR in both B and T cells. *Nat Immunol*.

- 2011;12(6):536–43.
170. Shi J, Chi S, Xue J, Yang J, Li F, Liu X. Emerging Role and Therapeutic Implication of Wnt Signaling Pathways in Autoimmune Diseases. *J Immunol Res*. 2016;2016:9392132.
171. Leone MA, Barizzzone N, Esposito F, Lucenti A, Harbo HF, Goris A, et al. Association of Genetic Markers with CSF Oligoclonal Bands in Multiple Sclerosis Patients. *PLoS One*. 2013;8(6):1–5.
172. Babron M-C, Perdry H, Handel AE, Ramagopalan S V, Damotte V, Fontaine B, et al. Determination of the real effect of genes identified in GWAS: the example of IL2RA in multiple sclerosis. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(3):321–5.
173. Colombo T, Farina L, Macino G, Paci P. PVT1: A rising star among oncogenic long noncoding RNAs. *Biomed Res Int*. 2015;2015:304208.
174. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007;282(16):11613–7.
175. Disanto G, Sandve GK, Berlanga-Taylor AJ, Morahan JM, Dobson R, Giovannoni G, et al. Genomic regions associated with multiple sclerosis are active in b cells. *PLoS One*. 2012;7(3):1–7.
176. Ouimet T, Facchinetti P, Rose C, Bonhomme MC, Gros C, Schwartz JC, et al. Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;271(3):565–70.
177. Hodson DJ, Janas ML, Galloway A, Bell SE, Andrews S, Li CM, et al. Deletion of the RNA-binding proteins Zfp3611 and Zfp3612 leads to perturbed thymic development and T-lymphoblastic leukaemia. *Nat Immunol*. 2010;11(8):717–24.
178. Nasir A, Norton JD, Baou M, Zekavati A, Bijlmakers MJ, Thompson S, et al. ZFP36L1 Negatively Regulates Plasmacytoid Differentiation of BCL1 Cells by Targeting BLIMP1 mRNA. *PLoS One*. 2012;7(12):1–13.
179. Hoppenbrouwers IA, Aulchenko YS, Janssens AC, Ramagopalan S V, Broer L, Kayser M, et al. Replication of CD58 and CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis. *J Hum Genet*. 2009;54(11):676–80.
180. Ruland J, Duncan GS, Wakeham A, Mak TW. Differential Requirement for Malt1 in T and B Cell Antigen Receptor Signaling. *Immunity*. 2003;19(5):749–58.
181. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet*. 2010;19(5):953–62.
182. Mohammed EMA. Multiple sclerosis is prominent in the Gulf states: Review. *Pathogenesis*. 2016;3(2):19–38.
183. Ma AD, Abrams CS. Pleckstrin induces cytoskeletal reorganization via a Rac-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1999;274(40):28730–5.
184. Lian L, Wang Y, Flick M, Choi J, Scott EW, Degen J, et al. Loss of pleckstrin defines a novel pathway for PKC-mediated exocytosis. *Blood*. 2009;113(15):3577–84.

185. Bogue CW, Zhang P-X, McGrath J, Jacobs HC, Fuleihan RL. Impaired B cell development and function in mice with a targeted disruption of the homeobox gene *Hex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(2):556–61.
186. Gourraud P-A, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev*. 2012;248(1):87–103.
187. Lesourne R, Uehara S, Lee J, Song K-D, Li L, Pinkhasov J, et al. THEMIS, a new T cell specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol*. 2009;10(8):840–7.
188. Brütting C, Emmer A, Kornhuber M, Staeger MS. A survey of endogenous retrovirus (ERV) sequences in the vicinity of multiple sclerosis (MS)-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Mol Biol Rep*. 2016;43(8):827–36.
189. Ban M, Goris A, Lorentzen AR, Baker A, Mihalova T, Ingram G, et al. Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(10):1309–13.
190. Farh KK, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and Epigenetic Fine-Mapping of Causal Autoimmune Disease Variants. *Nature*. 2015;518(7539):337–43.
191. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD80 and CD86 Are Not Equivalent in Their Ability to Induce the Tyrosine Phosphorylation of CD28\*. *J Biol Chem*. 1999;274(5):3116–24.
192. Isobe N, Madireddy L, Khankhanian P, Matsushita T, Caillier SJ, More JM, et al. An ImmunoChip study of multiple sclerosis risk in African Americans. *Brain*. 2015;138(6):1518–30.
193. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium IMSGC. Network-based multiple sclerosis pathway analysis with GWAS data from 15,000 cases and 30,000 controls. *Am J Hum Genet*. 2013;92(6):854–65.
194. Transplantation Immunology [Internet]. Ginebra. 2015. Available from: [http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/donor/HLA\\_typing/SSO.php](http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/donor/HLA_typing/SSO.php)
195. Goris A, Walton A, Ban M, Dubois B, Compston A, Sawcer S. A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1 \* 1501 allele. *Tissue Antigens*. 2008;72(4):401–3.
196. Goodin D, Frohman E, Hurwitz B, O'Connor P, Oger J, Reder A, et al. Neutralizing antibodies to interferon beta: Assessment of their clinical and radiographic impact: An evidence report: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2007;68(13):977–84.
197. Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mendes MF, Kaimen-Maciél, D.R. Callegaro D. Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. *Rev Neurol*. 2002;34(4):378–83.
198. Hickey WF. The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J Neuroimmunol*. 1999;98(1):37–44.
199. Munger KL, Levin LI, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study

- among United States military personnel . *Mult Scler.* 2011;17(10):1185–93.
200. Ingram G, Bugert JJ, Loveless S, Robertson NP. Anti-EBNA-1 IgG is not a reliable marker of multiple sclerosis clinical disease activity. *Eur J Neurol.* 2010;17(11):1386–9.
201. Gieß RM, Pfuhl C, Behrens JR, Rasche L, Freitag E, Khalighy N, et al. Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLoS One.* 2017;12(4):1–14.
202. Mouhieddine TH, Darwish H, Fawaz L, Yamout B, Tamim H, Khoury SJ. Risk factors for multiple sclerosis and associations with anti-EBV antibody titers. *Clin Immunol.* 2015;158(1):59–66.
203. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol.* 2013;13(1):1–13.
204. Al-Temaimi R, Alroughani R, Jacob S, Al-Mulla F. Gender influence in EBV antibody response in multiple sclerosis patients from Kuwait. *J Neuroimmunol.* 2015;285:57–61.
205. Castellazzi M, Contini C, Tamborino C, Fasolo F, Roversi G, Seraceni S, et al. Epstein-Barr virus-specific intrathecal oligoclonal IgG production in relapsing-remitting multiple sclerosis is limited to a subset of patients and is composed of low-affinity antibodies. *J Neuroinflammation.* 2014;11(1):1–12.
206. Pachner AR, Steiner I. The multiple sclerosis severity score (MSSS) predicts disease severity over time. *J Neurol Sci.* 2009;278(1–2):66–70.
207. Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamaño-Blanco M, et al. Environmental Factors Associated with Disease Progression after the First Demyelinating Event: Results from the Multi-Center SET Study. *PLoS One.* 2013;8(1):1–8.
208. Zivadinov R, Zorzon M, Weinstock-Guttman B, Serafin M, Bosco a, Bratina a, et al. Epstein-Barr virus is associated with grey matter atrophy in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(6):620–5.
209. Lünemann JD, Tintoré M, Messmer B, Strowig T, Rovira Á, Perkal H, et al. Elevated EBNA1 Immune Responses Predict Conversion to Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;67(2):159–69.
210. Farrell RA, Antony D, Wall GR, Clark DA, Fisniku L, Swanton J, et al. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology.* 2009;73(1):32–8.
211. Torkildsen Ø., Nyland H, Myrmed H, Myhr KM. Epstein-Barr virus reactivation and multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2008;15(1):106–8.
212. Frappier L. EBNA1 and host factors in Epstein-Barr virus latent DNA replication. *Curr Opin Virol.* 2012;2(6):733–9.
213. Lünemann JD, Edwards N, Muraro PA, Hayashi S, Cohen JI, Münz C, et al. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain.* 2006;129(6):1493–506.

214. Selter RC, Biberacher V, Grummel V, Buck D, Eienbröcker C, Oertel WH, et al. Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler J*. 2013;19(11):1454–61.
215. Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: Interaction with HLA. *Genes Immun*. 2012;13(1):14–20.
216. Spadaro M, Montarolo F, Perga S, Martire S, Brescia F, Malucchi S, et al. Biological activity of glatiramer acetate on Treg and anti-inflammatory monocytes persists for more than 10 years in responder multiple sclerosis patients. *Clin Immunol*. 2017;181:83–8.
217. Skarica M, Eckstein C, Whartenby KA, Calabresi PA. Novel mechanisms of immune modulation of natalizumab in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2011;235(1–2):70–6.
218. Pender MP, Csurhes PA, Lenarczyk A, Pfluger CMM, Burrows SR. Decreased T cell reactivity to Epstein – Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(5):498–505.
219. Pender MP, Csurhes PA, Burrows JM, Burrows SR. Defective T-cell control of Epstein – Barr virus infection in multiple sclerosis. *Clin Transl Immunol*. 2017;6(1):1–17.
220. Dhib-jalbut S, Marks S. Interferon - $\beta$  mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(Suppl 1):S17–24.
221. Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, et al. HLA-DR2 Dose Effect on Susceptibility to Multiple Sclerosis and Influence on Disease Course. *Am J Hum Genet*. 2003;72(3):710–6.
222. Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Zorzon M, Uxa L, Serafin M, Bosco A, et al. Gene-environment interactions between HLA B7/A2, EBV antibodies are associated with MRI injury in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009;209(1–2):123–30.
223. Sadovnick a. D. Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2012;11(3):163–6.
224. Fernández O, Fernández V, Alonso A, Caballero A, Luque G, Bravo M, et al. DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol*. 2004;251(4):440–4.
225. Gough SCL, Simmonds MJ. The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. *Curr Genomics*. 2007;8(7):453–65.
226. Li Q, Spriggs M, Susan K, Turk SM, Comeau MR, Nepon B, et al. Epstein-Barr Virus Uses HLA Class II as a Cofactor for Infection of B Lymphocytes. *J Virol*. 1997;71(6):4657–62.
227. Sathiyamoorthy K, Hu YX, Möhl BS, Chen J, Longnecker R, Jardetzky TS. Structural basis for Epstein-Barr virus host cell tropism mediated by gp42 and gHgL entry glycoproteins. *Nat Commun*. 2016;7:1–14.
228. Rensing ME, van Leeuwen D, Verreck FAW, Gomez R, Heemskerk B, Toebe M, et al. Interference with T cell receptor-HLA-DR interactions by Epstein-Barr

- virus gp42 results in reduced T helper cell recognition. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(20):11583–8.
229. Strautins K, Tschochner M, James I, Choo L, Dunn DS, Pedrini M, et al. Combining HLA-DR risk alleles and anti-Epstein-Barr virus antibody profiles to stratify multiple sclerosis risk. *Mult Scler J.* 2014;20(3):286–94.
230. Sospedra M, Martin R. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Autoimmunity.* 2006;39(1):3–8.
231. Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2007;165(10):1097–109.
232. Aláez C, Corona T, Ruano L, Flores H, Loyola M, Gorodezky C. Mediterranean and Amerindian MHC class II alleles are associated with multiple sclerosis in Mexicans. *Acta Neurol Scand.* 2005;112(5):317–22.
233. Zivadinov R, Uxa L, Bratina A, Bosco A, Srinivasaraghavan B, Minagar A, et al. HLA-DRB1\*1501, -DQB1\*0301, -DQB1\*0302, -DQB1\*0602, and -DQB1\*0603 Alleles are Associated With More Severe Disease Outcome on MRI in Patients With Multiple Sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:521–35.
234. Li Q, Bu W, Gabriel E, Aguilar F, Hoshino Y, Miyadera H, et al. HLA-DQ  $\beta$ 1 alleles associated with Epstein-Barr virus (EBV) infectivity and EBV gp42 binding to cells. *JCI Insight.* 2017;2(4):1–17.
235. Laaksonen M, Pastinen T, Sjöroos M, Kuokkanen S, Ruutiainen J, Sumelahti M-L, et al. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis - A Finnish family study. *J Neuroimmunol.* 2002;122(1–2):140–5.
236. Ono T, Zambenedetti MR, Yamasaki K, Kawano Y, Kamikawaji N, Ito H, et al. Molecular analysis of HLA class I (HLA-A and -B) and HLA class II (HLA-DRB1) genes in Japanese patients with multiple sclerosis (Western type and Asian type). *Tissue Antigens.* 1998;52(6):539–42.
237. S.W.Serjeantson, X.Gao, Hawkins BR, Higgins DA, Yu YL. Novel HLA-DR2-Related haplotypes in Hong Kong Chinese implicate the DQB1\*0602 allele in susceptibility to Multiple Sclerosis. *Eur J Immunogenet.* 1992;19(1–2):11–9.
238. M Allen, M Sandberg-Wollheim, K Sjögren HE. Association of susceptibility to multiple sclerosis in Sweden with HLA class II DRB1 and DQB1 alleles. *Hum Immunol.* 1994;39(1):41–8.
239. Fernández O, R-Antigüedad A, Pinto-Medel MJ, Mendibe MM, Acosta N, Oliver B, et al. HLA class II alleles in patients with multiple sclerosis in the Biscay province (Basque Country, Spain). *J Neurol.* 2009;256(12):1977–88.
240. Kaushansky N, Altmann DM, David CS, Lassmann H, Ben-Nun A. DQB1\*0602 rather than DRB1\*1501 confers susceptibility to multiple sclerosis-like disease induced by proteolipid protein (PLP). *J Neuroinflammation.* 2012;9:1–15.
241. Spurkland A, Celius EG, Knutsen I, Beiske A, Thorsby E, Vartdal E. The HLA-DQ( $\alpha$ 1\*0102,  $\beta$ 1\*0602) heterodimer may confer susceptibility to multiple sclerosis in the absence of the HLA-DR( $\alpha$ 1\*01,  $\beta$ 1\*1501) heterodimer. *Tissue Antigens.* 1997;50(1):15–22.
242. Caballero A, Alvés-León S, Papais-Alvarenga R, Fernández O, Navarro G,



- Alonso A. DQB1\*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens*. 1999;54(5):524–6.
243. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC, et al. The Transcription Factors T-bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation. *Immunity*. 2012;36(1):55–67.
244. Parnell GP, Gatt PN, Krupa M, Nickles D, McKay FC, Schibeci SD, et al. The autoimmune disease-associated transcription factors EOMES and TBX21 are dysregulated in multiple sclerosis and define a molecular subtype of disease. *Clin Immunol*. 2014;151(1):16–24.
245. Min HS, Lee YJ, Jeon YK, Kim EJ, Kang BH, Jung KC, et al. MHC Class II-Restricted Interaction between Thymocytes Plays an Essential Role in the Production of Innate CD8+ T Cells. *J Immunol*. 2011;186(10):5749–57.
246. McKay FC, Gatt PN, Fewings N, Parnell GP, Schibeci SD, Basuki MAI, et al. The low EOMES/TBX21 molecular phenotype in multiple sclerosis reflects CD56+ cell dysregulation and is affected by immunomodulatory therapies. *Clin Immunol*. 2016;163(2016):96–107.
247. Chen S, Zhang J, Liu Q-B, Zhuang J-C, Wu L, Xu Y-F, et al. Variant of EOMES Associated with Increasing Risk in Chinese Patients with Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *Chin Med J (Engl)*. 2018;131(6):643–7.
248. Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, et al. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol*. 1996;16(11):6083–95.
249. Kjeldsen M, Dybkaer K, Liu J, Pedersen F. BACH2 (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2010;14(10):930–3.
250. Perga S, Montarolo F, Martire S, Berchiolla P, Malucchi S, Bertolotto A. Anti-inflammatory genes associated with multiple sclerosis: A gene expression study. *J Neuroimmunol*. 2015;279:75–8.
251. Takakuwa T, Luo WJ, Ham MF, Sakane-Ishikawa F, Wada N, Aozasa K. Integration of Epstein-Barr Virus into Chromosome 6q15 of Burkitt Lymphoma Cell Line (Raji) Induces Loss of BACH2 Expression. *Am J Pathol*. 2004;164(3):967–74.
252. Wallet MA, Sen P, Flores RR, Wang Y, Yi Z, Huang Y, et al. MerTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance. *J Exp Med*. 2008;205(1):219–32.
253. Wallet MA, Flores RR, Wang Y, Yi Z, Kroger CJ, Mathews CE, et al. MerTK regulates thymic selection of autoreactive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(12):4810–5.
254. Gaip US, Franz S, Voll RE, Sherif A, Kalden JR, Herrmann M. Defects in the disposal of dying cells lead to autoimmunity. *Curr Rheumatol Rep*. 2004;6(6):401–7.
255. Cabezon R, Carrera-Silva EA, Florez-Grau G, Errasti AE, Calderon-Gomez E, Lozano JJ, et al. MERTK as negative regulator of human T cell activation. *J Leukoc Biol*. 2015;97(4):751–60.

256. Ma GZM, Stankovich J, (ANZgene) the australia and new zealand multiple sclerosis genetics consortium, Kilpatrick TJ, Binder MD, Field J. Polymorphisms in the Receptor Tyrosine Kinase MERTK Gene Are Associated with Multiple Sclerosis Susceptibility. *PLoS One*. 2011;6(2):1–6.
257. Binder MD, Fox AD, Merlo D, Johnson LJ, Giuffrida L, Calvert SE, et al. Common and Low Frequency Variants in MERTK Are Independently Associated with Multiple Sclerosis Susceptibility with Discordant Association Dependent upon HLA-DRB1\*15:01 Status. *PLoS Genet*. 2016;12(3):1–25.
258. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1704–12.
259. Akkad DA, Bellenberg B, Esser S, Weiler F, Epplen JT, Gold R, et al. Multiple sclerosis risk loci correlate with cervical cord atrophy and may explain the course of disability. *Neurogenetics*. 2015;16(3):161–8.
260. Jazaeri A, Vallian S. Association of rs1738074 polymorphism of TAGAP gene with susceptibility to multiple sclerosis in the Iranian population. *Neurosci Lett*. 2017;648:66–9.
261. Tamehiro N, Nishida K, Yanobu-Takanashi R, Goto M, Okamura T, Suzuki H. T-cell activation RhoGTPase-activating protein plays an important role in TH17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(8):729–35.
262. Michael Auer, Wegene Borena, Dorothee Holm-von Laer and FD. Correlation Between Anti-JC-Virus and Anti-Cytomegalovirus, -Epstein-Barr Virus and - Measles/-Rubella/-Varicella-Zoster-Virus Antibodies. *J Med Virol*. 2017;89(1):3–9.
263. Malyavantham K, Weinstock-Guttman B, Suresh L, Zivadinov R, Shanahan T, Badgett D, et al. Humoral responses to diverse autoimmune disease-associated antigens in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015;10(6):1–15.
264. Pandit L, Malli C, Cunha AD, Shetty R, Singhal B. Association of Epstein-Barr virus infection with multiple sclerosis in India. *J Neurol Sci*. 2013;325(1–2):86–9.
265. De Jager PL, Simon KC, Munger KL, Rioux JD, Hafler DA, Ascherio A. Integrating risk factors HLA-DRB1\* 1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology*. 2008;70(13 Part 2):1113–8.
266. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelmann JH, Ascherio A. Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. Evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol*. 2006;63(6):839–44.
267. Lindsey JW, Hatfield LM, Vu T. Epstein-Barr virus neutralizing and early antigen antibodies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2010;17(10):1263–9.
268. Mameli G, Cossu D, Cocco E, Masala S, Frau J, Marrosu MG, et al. EBNA-1 IgG titers in Sardinian multiple sclerosis patients and controls. *J Neuroimmunol*. 2013;264(1–2):120–2.
269. Pohl D, Krone B, Rostasy K, Kahler E, Brunner E, Lehnert M, et al. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology*. 2006;67(11):2063–5.

270. Abdelrahman HS, Selim HS, Hashish MH, Sultan LI. Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. J Egypt Public Health Assoc. 2014;89(2):90–5.